



Telma da Piedade Silva

Licenciada em Engenharia Alimentar

Avaliação dos antioxidantes presentes nas águas de processo da indústria corticeira

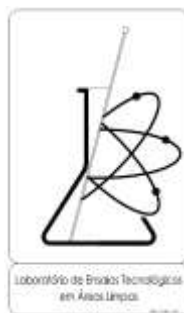
Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Rita Galvão, Mestre, ITN
Co-orientador: Margarida Gonçalves, Prof. Doutora, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor(a) Ana Luísa Fernando
Arguente(s): Prof. Doutor(a) Maria do Rosário Beja Figueiredo Gonzaga Bronze
Eng.^a Sónia Alexandra Felício Ribeiro
Vogal(ais): Prof. Doutor(a) Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves
Mestre Rita Lourenço Paiva de Melo Galvão

Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa



AVALIAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES PRESENTES NAS ÁGUAS DE PROCESSO DA INDÚSTRIA CORTICEIRA

TELMA DA PIEDADE SILVA

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

ORIENTADOR: Mestre Rita Melo

CO-ORIENTADOR: Professora Doutora Margarida Gonçalves

Lisboa

Outubro de 2011

Ao meu grande Amor

Agradecimentos

Concluído este trabalho, não poderia deixar passar a oportunidade de agradecer a todos os que contribuíram, directa ou indirectamente, para a sua conclusão.

Agradeço à minha orientadora, Mestre Rita Melo, por me ter proposto este desafio, pela ajuda que me deu e por ver sempre uma solução quando nada parecia resultar. És uma pessoa fantástica e uma orientadora sem igual!

À Doutora Luísa Botelho por me ter dado a oportunidade de, mais uma vez, trabalhar com este Grupo estupendo, pelos *brainstorming* e por ter sempre uns minutos para me esclarecer em todas as dúvidas.

À Doutora Margarida Gonçalves, minha co-orientadora, agradeço a disponibilidade, apoio e orientação durante a realização do estágio.

À Doutora Benilde Mendes, coordenadora do Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar, pela sua enorme simpatia e profissionalismo.

À Fabricor, em especial à Engenheira Sónia Ribeiro, por me ter permitido fazer as recolhas e pela simpatia com que sempre me receberam.

Ao Doutor João Paulo Leal, Doutor João Paulo Noronha e Ricardo por todo o apoio e disponibilidade.

Aos meus colegas de trabalho: Chefe, Rita, Lena, Sandra, Marina, Ana, Vânia, Inês, Pedro, Joana, Pamela, Amílcar, que foram uma parte tão importante da minha vida, ajudaram-me a crescer e que estiveram sempre lá! Obrigadinha!!!

À Andreia por todo o apoio laboratorial e por me receber sempre com um sorriso.

Aos meus Pais pela compreensão, carinho e apoio demonstrado nesta fase tão importante da minha vida. Ao meu querido irmão, Bruno, à Madalena e aos meus fantásticos sobrinhos que me dão tantas alegrias! Obrigada por todo o apoio e por acreditarem em mim.

À Marina pela sua amizade incondicional e por nunca me deixar ir abaixo. O que seria das nossas teses se não tivéssemos mandado a moedinha...!

Ao meu querido Carlos Pedro por me fazer sorrir todos os dias e viver a vida com mais calma e ponderação! És o meu equilíbrio.

A todos MUITO OBRIGADA!

Resumo

Os antioxidantes são largamente utilizados pelas indústrias alimentares, farmacêuticas, cosméticas, curtumes, entre outras. Nestas aplicações é frequente o recurso aos antioxidantes artificiais. A possibilidade de reutilização de antioxidantes naturais (nomeadamente compostos fenólicos), com vantagens económicas e qualitativas, nestes processos industriais representa uma importante área de estudo. Este trabalho pretendeu estudar o conteúdo em compostos fenólicos e a actividade antioxidante das águas de processo (água de cozedura e efluente bruto) de uma indústria corticeira, para avaliar o seu potencial uso como fonte de antioxidantes naturais. Os resultados obtidos apontam para uma maior biodegradabilidade do efluente bruto relativamente à água de cozedura. A actividade antioxidante é superior na água de cozedura, quando avaliada pelo método de fotoquimioluminescência (sequestração do anião radical superóxido), idêntica pelo método de DPPH (sequestração do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), e inferior na água de cozedura na metodologia de FRAP (actividade redutora férrica). Relativamente ao conteúdo fenólico (reação de Folin-Ciocalteu) e concentração de ácido gálico nas amostras, a água de cozedura apresenta valores superiores relativamente ao efluente bruto. Os resultados obtidos apontam para um maior potencial de reaproveitamento de antioxidantes da água de cozedura, rentabilizando este produto subsidiário.

Palavras-chave: Antioxidantes, actividade antioxidante, cortiça, água de cozedura, efluente bruto

Abstract

Antioxidants use is widespread in the food, pharmaceutical, cosmetic, and leather industries. Usually artificial antioxidants are applied in these industries. The possible use of natural antioxidants (*e.g.* phenolic compounds) in these industrial processes is an important economic and scientific issue. This work aimed to study the phenolic content and antioxidant activity of the process waters (boiling water and raw effluent) of a cork industry, evaluating its potential use as a source of natural antioxidants. The results obtained point out that the raw effluent has higher biodegradability than the boiling water. The antioxidant activity is higher in the boiling water, as measured by the method of photochemiluminescence (sequestration of the superoxide radical anion), is similar for both samples by the DPPH assay (radical sequestration 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl), and lower in the boiling water as measured by the FRAP method (ferric reducing activity). Concerning phenolic content (Folin-Ciocalteu reaction) and gallic acid concentration in the samples, the boiling water shows higher values than raw effluent. These results indicate that the cork boiling water could have a greater potential for reuse of antioxidants, adding value to this by-product.

Keywords: Antioxidants, antioxidant activity, cork, cork boiling water, raw wastewater

Índice Matérias

Capítulo 1 - Introdução.....	1
1.1. Objectivos.....	3
1.1.1. Objectivo geral.....	3
1.1.2. Objectivos específicos.....	3
1.2. Antioxidantes.....	4
1.2.1. Classificação.....	5
1.2.1.1. Mecanismos de reacção.....	6
1.2.2. Compostos fenólicos.....	7
1.2.3. Antioxidantes na saúde, alimentação e indústria alimentar.....	8
1.3. Caracterização da cortiça.....	10
1.3.1. <i>Quercus suber</i>	10
1.3.2. Morfologia e composição química.....	10
1.3.3. Indústria Corticeira.....	12
1.3.4. Fabricor.....	14
1.3.4.1. Água de cozedura.....	15
1.3.4.2. Efluente bruto.....	16
1.4. Valorização de efluentes da Indústria Corticeira como fontes de compostos antioxidantes.....	17
Capítulo 2 - Materiais e Métodos.....	19
2.1. Tratamento estatístico.....	21

2.2.	Amostragem.....	21
2.3.	Parâmetros analisados.....	22
2.3.1.	Carência Química de Oxigénio	22
	Princípio do método	22
	Procedimento experimental.....	23
	Correcção do valor experimental da CQO utilizando um padrão de CQO conhecida (valor teórico)	24
2.3.2.	Carência Bioquímica de Oxigénio	24
	Princípio do método	24
	Procedimento experimental.....	24
2.3.3.	Carbono Orgânico Total.....	25
	Princípio do método	25
	Procedimento experimental.....	26
2.3.4.	Determinação de Compostos Fenólicos Totais (Reacção de Folin-Ciocalteu) .	26
	Princípio do método	26
	Procedimento experimental.....	26
2.3.5.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	27
	Princípio do método	27
	Procedimento experimental.....	28
2.3.6.	Espectrometria de Massa com Ionização por Electrospray	28

Princípio do método	28
Procedimento experimental.....	29
2.3.7. Determinação da actividade antioxidante	30
2.3.7.1. Reacção de sequestração do radical DPPH'	30
Princípio do método	30
Procedimento experimental.....	31
2.3.7.2. Sequestração do radical anião superóxido seguida por fotoquimioluminescência	31
Princípio do método	31
Procedimento experimental.....	34
2.3.7.3. Poder antioxidante de redução férrica (FRAP)	35
Princípio do método	35
Procedimento experimental.....	36
Capítulo 3 - Apresentação e Discussão de Resultados	37
3.1. Amostragem.....	39
3.2. Parâmetros gerais avaliadores do efluente	39
3.3. Compostos fenólicos totais (Folin-Ciocalteu)	40
3.4. Separação e identificação dos compostos em estudo por cromatografia líquida de alta eficiência	42
3.5. Espectrometria de massa por ionização por electrospray	44
3.6. Determinação da actividade antioxidante	48

3.6.1.	Reacção de sequestração do radical DPPH [•]	48
3.6.2.	Fotoquimioluminescência (Photochem [®]).....	49
3.6.3.	Poder antioxidante de redução férrica (FRAP)	52
3.7.	Correlações	53
Capítulo 4 - Conclusões e Trabalho Futuro		57
4.1.	Conclusões	59
4.2.	Trabalho futuro.....	63
Capítulo 5 - Referências Bibliográficas		65
5.1.	Referências bibliográficas	67
Anexos.....		73
Anexo I.....		75
A.	Correcção de erros sistemáticos na determinação da CQO.....	75
Anexo II		77
A.	Cálculo dos compostos fenólicos totais através da reacção de Folin-Ciocalteu	77
B.	Cálculo da concentração de compostos referência por HPLC	78
C.	Reacção de sequestração do radical DPPH [•]	80
D.	Cálculo da actividade antiradicalar relativa ao anião radical superóxido por fotoquimioluminescência para extractos aquosos (ACW)	83
E.	Cálculo da actividade antiradicalar relativa ao anião radical superóxido por fotoquimioluminescência para extractos lipídicos (ACL).....	85
F.	Cálculo do poder antioxidante de redução férrica (FRAP)	86

Índice de Figuras

Capítulo 1

Figura 1.1 – Célula da cortiça: A) Corte transversal; B) Corte tangencial (*in* Silva M., 2010) .. 11

Figura 1.2 – Estrutura celular da parede da cortiça (adaptado de Silva, et al., 2005) 12

Figura 1.3 – Distribuição do montado de sobreiro pelo Mediterrâneo..... 13

Figura 1.4 – Fluxograma do fabrico de rolhas de cortiça e locais de saída de águas de processo (adaptado de <http://www.fabricor.pt/>) 15

Capítulo 2

Figura 2.1 – Reacção de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH') 30

Figura 2.2 – Exemplo de curvas obtidas para ACW 32

Figura 2.3 – Exemplo de curvas obtidas para ACL 33

Figura 2.4 – Redução do complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ)..... 35

Capítulo 3

Figura 3.1 – Cromatogramas (a 280 nm) das recolhas de (a) água de cozedura (AC1R – 1ª recolha; AC2R – 2ª recolha e AC3R – 3ª recolha); e de (b) efluente bruto (EB1R – 1ª recolha; EB2R – 2ª recolha e EB3R – 3ª recolha)..... 43

Figura 3.2 – Cromatogramas (a 280 nm) de água de cozedura (a) e do efluente bruto (b) da 2ª recolha com adição dos diferentes padrões 44

Figura 3.3 – Espectro de massa do ácido gálico; (a) modo negativo; (b) modo positivo..... 45

Figura 3.4 – Espectro de massa do ácido ferúlico; (a) modo negativo; (b) modo positivo 45

Figura 3.5 – Espectro de massa da água de cozedura, 1ª recolha; (a) modo negativo; (b) modo positivo..... 46

Figura 3.6 – Espectro de massa do efluente bruto, 1ª recolha; (a) modo negativo; (b) modo positivo.....	47
---	----

Anexos

Figura 6.1 – $CQO_{\text{experimental}}$ em função $CQO_{\text{teórico}}$	75
Figura 6.2 – Recta de calibração para o ácido gálico após reacção de Folin-Ciocalteu.....	77
Figura 6.3 – Recta de calibração para as diferentes concentrações de ácido gálico (a 280 nm) .	78
Figura 6.4 – Recta de calibração para as diferentes concentrações de ácido ferúlico (a 280 nm)	79
Figura 6.5 – Recta de calibração para as diferentes concentrações de hidroquinona (a 280 nm)	80
Figura 6.6 – % Inibição do DPPH para as várias concentrações de ácido gálico (a); ácido ferúlico (b); hidroquinona (c).....	82
Figura 6.7 – Recta de calibração do ácido ascórbico	84
Figura 6.8 – Recta de calibração do trolox.....	85
Figura 6.9 – Recta de calibração para o método FRAP	87

Índice de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1.1 – Exemplos de estruturas dos ácidos fenólicos	8
--	---

Tabela 1.2 – Produção de cortiça em 2007	14
--	----

Capítulo 2

Tabela 2.1 – Soluções-padrão de ácido ascórbico.....	34
--	----

Tabela 2.2 – Soluções padrão de trolox	35
--	----

Capítulo 3

Tabela 3.1 – Data das recolhas efectuadas	39
---	----

Tabela 3.2 – Parâmetros físico-químicos das amostras em estudo	39
--	----

Tabela 3.3 – Compostos fenólicos totais nas amostras	40
--	----

Tabela 3.4 – Caracterização físico-química da água de cozedura.....	41
---	----

Tabela 3.5 – Concentração de ácido gálico em ambas as recolhas das águas residuais.....	43
---	----

Tabela 3.6 – Resumo dos compostos identificados pela técnica ESI-MS.....	47
--	----

Tabela 3.7 – % Inibição do radical DPPH [•] e EC ₅₀ para os compostos padrão	48
--	----

Tabela 3.8 – % Inibição do radical DPPH [•]	49
--	----

Tabela 3.9 – Resultados do Photochem [®] para as amostras	50
--	----

Tabela 3.10 – Resultados do Photochem [®] para os compostos padrão (1,5x10 ⁻⁷ μmol/mL)	51
--	----

Tabela 3.11 – Resultados do Photochem [®] das amostras	51
---	----

Tabela 3.12 – Resultados obtidos para o FRAP para os compostos padrão (0,5 mM)	52
--	----

Tabela 3.13 – Resultados obtidos do FRAP para as amostras	53
Tabela 3.14 – Classificação da linearidade	53
Tabela 3.15 – Coeficientes de correlação entre os métodos avaliados (água de cozedura)	54
Tabela 3.16 – Coeficientes de correlação entre os métodos avaliados (efluente bruto).....	55

Anexos

Tabela 6.1 – CQO teórica e experimental para soluções-padrão com diferentes concentrações de KHP.....	75
Tabela 6.2 – Absorvância a 765nm das soluções-padrão de ácido gálico após a reacção de Folin-Ciocalteu	77
Tabela 6.3 – Área do pico cromatográfico do ácido gálico em função da concentração	78
Tabela 6.4 – Área do pico cromatográfico do ácido ferúlico em função da concentração	79
Tabela 6.5 – Área do pico cromatográfico do hidroquinona em função da concentração	80
Tabela 6.6 – % Inibição do radical DPPH [*] para os compostos padrão	81
Tabela 6.7 – Concentrações de ácido ascórbico e respectiva inibição do radical	83
Tabela 6.8 – Concentrações de trolox e respectiva inibição do radical.....	85
Tabela 6.9 – Absorvância a 593nm do sulfato ferroso a diferentes concentrações.....	86

Lista de abreviaturas

CBO	Carência Bioquímica de Oxigênio
CQO	Carência Química de Oxigênio
COT	Carbono Orgânico Total
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida de alta eficiência)
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> (poder antioxidante de redução férrica)
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (ionização por electrospray)
ACW	<i>Antioxidant Capacity of Water soluble substances</i> (capacidade antioxidante de substâncias hidrossolúveis)
ACL	<i>Antioxidant Capacity of Lipid soluble substances</i> (capacidade antioxidante de substâncias lipossolúveis)
TPTZ	2,4,6-tri[2-piridil]-s-triazina
ERO	Espécies Reactivas de Oxigênio
ERA	Espécies Reactivas de Azoto

Capítulo 1 - Introdução

1.1. OBJECTIVOS

1.1.1. OBJECTIVO GERAL

O presente estudo teve como objectivo geral a identificação de três potenciais compostos antioxidantes presentes nas amostras (águas residuais da indústria corticeira) em estudo, nomeadamente ácido gálico, ácido ferúlico e hidroquinona, bem como a sua quantificação e avaliação do seu potencial antioxidante.

A determinação dos principais parâmetros avaliadores da qualidade das águas residuais permitirá estimar a carga orgânica e inorgânica das águas de processo da indústria corticeira.

1.1.2. OBJECTIVOS ESPECÍFICOS

Os objectivos específicos do estudo apresentado foram:

1. Determinar a carência química de oxigénio (CQO), a carência bioquímica de oxigénio (CBO), o carbono orgânico total (COT), a biodegradabilidade e o pH;
2. Avaliar o conteúdo em compostos fenólicos;
3. Identificar e quantificar os três antioxidantes em estudo;
4. Avaliar a actividade antioxidante por três métodos distintos;
5. Comparação das diferentes metodologias aplicadas nas duas amostras.

O presente trabalho encontra-se dividido em cinco capítulos. No Capítulo 1 são desenvolvidos os enquadramentos teóricos do estudo efectuado, o estado da arte e a caracterização da indústria onde se efectuou a amostragem. No Capítulo 2 são apresentadas as metodologias e as técnicas utilizadas como suporte deste trabalho. Os resultados obtidos bem como uma breve discussão dos mesmos encontram-se no Capítulo 3. As conclusões retiradas das análises efectuadas bem como os trabalhos a desenvolver no futuro são apresentados no Capítulo 4 e, por último, as referências bibliográficas utilizadas para a elaboração do trabalho encontram-se no Capítulo 5.

1.2. ANTIOXIDANTES

Em sistemas biológicos, um antioxidante é uma substância com capacidade de reduzir eficazmente um pro-oxidante, com formação simultânea de produtos com baixo ou nenhum nível de toxicidade (Magalhães, Segundo, Reis, & Lima, 2008). Em 1995, Halliwell e colaboradores sugerem uma definição generalista para os antioxidantes: “qualquer substância que mesmo estando presente em baixas concentrações quando comparada com o substrato oxidável, apresenta capacidade para atrasar ou inibir de forma eficaz esse substrato” (*in* (Magalhães, Segundo, Reis, & Lima, 2008). As substâncias pró-oxidantes, por sua vez, apresentam capacidade de induzir danos oxidativos em diferentes alvos biológicos (*e.g.* ácidos nucleicos, lípidos e proteínas) (Magalhães, Segundo, Reis, & Lima, 2008).

A oxidação nos sistemas biológicos ocorre devido à acção dos radicais livres no organismo. Os radicais livres são espécies químicas com um electrão desemparelhado, o que lhes confere grande afinidade electrónica e, portanto, grande reactividade (Boots, Haenen, & Bast, 2008). A formação de radicais livres pode dever-se a processos endógenos – processos bioquímicos associados ao metabolismo; ou a processos exógenos – reacções metabólicas provocadas pela exposição a agentes externos ao organismo (Soares, 2002).

O desequilíbrio entre espécies antioxidantes e pro-oxidantes nos sistemas biológicos é definido como *stress oxidativo* que tem como consequências um aumento intracelular de espécies reactivas. As espécies reactivas de oxigénio (ERO) e as espécies reactivas de azoto (ERA) são os pró-oxidantes mais comuns, podendo ser radicalares ou não radicalares, podendo ser as não radicalares mais lesivas a médio e longo prazo. O peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o oxigénio singlete (1O_2), o radical anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o ozono (O_3) e o radical hidroxilo (HO^{\cdot}) são alguns exemplos de ERO, enquanto o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) e o óxido nítrico (NO^{\cdot}) são exemplos de ERA (Boots, Haenen, & Bast, 2008) (Magalhães, Segundo, Reis, & Lima, 2008).

Muitos alimentos que fazem parte da dieta quotidiana são ricos em antioxidantes que promovem a prevenção e/ou redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Os antioxidantes podem ter acção directa na neutralização das acções dos radicais livres ou participar indirectamente nos sistemas enzimáticos com essa função (Shami & Moreira, 2004) (Moreira & Mancini-Filho, 2004).

O uso de antioxidantes é vulgar na indústria alimentar (*e.g.* óleos, gorduras e alimentos processados), com vista a prevenir ou retardar a deterioração oxidativa (aumentando o tempo de

vida útil), e manter o valor nutricional dos alimentos (Nakatani, 1996) (Martinez-Valverde, Periago, & Provan, 2002).

Segundo a Directiva 95/2/CE (1995), os antioxidantes utilizados pelas indústrias alimentares são “substâncias que prolongam a durabilidade dos géneros alimentícios, protegendo-os contra a deterioração causada pela oxidação, tal como a rancidez das gorduras e as alterações de cor”. As propriedades dos compostos antioxidantes justificam a sua adição a alimentos muito perecíveis (e.g. alimentos ricos em gorduras), pelo que são habitualmente utilizados como matérias-primas no sector alimentar (Prado, 2009). Os antioxidantes apresentam ainda grande interesse para os bioquímicos e para a área da saúde, pois podem contribuir para a protecção do organismo contra os danos causados pelas espécies reactivas, bem como em doenças degenerativas e inflamatórias (Boots, Haenen, & Bast, 2008).

Nos dias de hoje, tem-se dado preferência à utilização de antioxidantes naturais (e.g. tocoferóis, ácido ascórbico e compostos fenólicos) em detrimento dos artificiais (e.g. butil-hidroxi-anisol – BHA, butil-hidroxi-tolueno – BHT e butil-hidroquinona-terciária – TBHQ) devido à possibilidade de estes causarem efeitos indesejáveis em enzimas e órgãos humanos (Martinez-Valverde, Periago, & Provan, 2002) (Prado, 2009). Assim, existe um grande interesse por parte da comunidade científica em encontrar novos antioxidantes que sejam seguros e provenientes de fontes naturais (Nakatani, 1996) (Martinez-Valverde, Periago, & Provan, 2002).

1.2.1. CLASSIFICAÇÃO

Existem vários critérios de classificação de antioxidantes descritos na literatura.

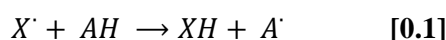
A abordagem seguida neste estudo baseia-se no trabalho descrito por Szymonik-Lesiuk, et al. (2003), que classificam os compostos antioxidantes conforme apresentem ou não actividade enzimática. No primeiro grupo encontram-se os compostos que apresentam capacidade de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reactivas de oxigénio, como por exemplo superóxido-dismutase, catalase, glutathione-peroxidase. Na segunda classe, estão moléculas que interagem com as espécies radicalares e que são consumidas durante a reacção, onde se incluem os compostos fenólicos, glutathione, ácido úrico, ácido ascórbico, tocoferóis, entre outros. Estes antioxidantes não-enzimáticos são obtidos através da dieta alimentar. (Szymonik-Lesiuk, et al., 2003) (Moreira & Mancini-Filho, 2004).

1.2.1.1. MECANISMOS DE REACÇÃO

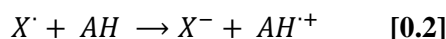
A determinação da capacidade antioxidante em sistemas biológicos encontra-se intimamente ligada com a origem da substância antioxidante e com os múltiplos radicais livres e pró-oxidantes existentes (Prior, Wu, & Schaich, 2005). Segundo Prior, et al. (2005) enzimas, moléculas de grande dimensão (*e.g.* proteínas), moléculas de dimensão mais reduzida (*e.g.* compostos fenólicos) e algumas hormonas, são as fontes de antioxidantes mais comuns.

Os antioxidantes podem manifestar comportamentos distintos aquando da reacção com diferentes radicais livres e pró-oxidantes. Os dois principais mecanismos de inibição de radicais por acção de antioxidantes são a transferência de átomo de hidrogénio e transferência de electrão único, que diferem essencialmente na cinética e meio reaccional. Estes mecanismos podem ocorrer em simultâneo, sendo o dominante determinado pelas propriedades, estrutura e solubilidade do antioxidante e pela natureza do solvente do sistema reaccional (Prior, Wu, & Schaich, 2005).

Os métodos que avaliam a capacidade antioxidante por transferência de átomo de hidrogénio baseiam-se na inibição (por acção de um antioxidante - *AH*) dos radicais livres (X^{\bullet}) através da doação hidrogénio (equação [1.1]) (Prior, Wu, & Schaich, 2005). Alguns exemplos de ensaios que envolvem a transferência de átomos de hidrogénio são: capacidade de absorção do radical de oxigénio (*oxygen radical absorbance capacity* – ORAC); capacidade sequestradora de radicais livres (*total radical-trapping antioxidant parameter* – TRAP), quimioluminescência e fotoquimioluminescência (Prior, Wu, & Schaich, 2005) (MacDonald-Wicks, Wood, & Garg, 2006).



A detecção da capacidade de um antioxidante transferir um electrão para reduzir compostos (*e.g.* metais e radicais) é avaliada pelos métodos de transferência de electrão, descrito pela equação [1.2]. Entre os métodos utilizados para determinar a capacidade antioxidante por esta reacção evidenciam-se a quantificação de fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu; método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico); poder redutor férrico (*ferric reducing antioxidant power* – FRAP); método de capacidade de redução do Cu (II); método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) e o método DMPD (N,N-dimetil-1,4-fenilenodiamina) (Prior, Wu, & Schaich, 2005) (MacDonald-Wicks, Wood, & Garg, 2006).



As reacções por transferência de electrões ocorrem, geralmente, de forma mais lenta que as reacções por transferência de átomos de hidrogénio (Prior, Wu, & Schaich, 2005).

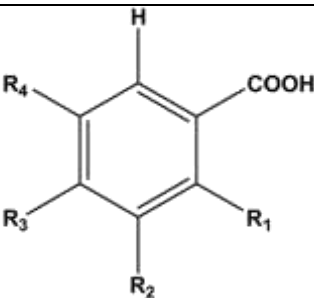
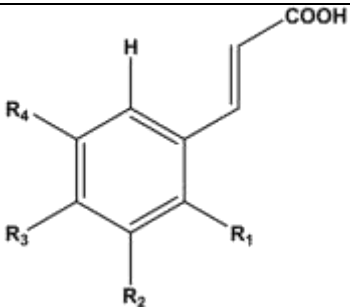
1.2.2. COMPOSTOS FENÓLICOS

São diversas as fontes antioxidantes naturais conhecidas na natureza, sendo algumas amplamente encontradas no reino vegetal. O seu poder antioxidante poderá ser atribuído ao conteúdo em compostos fenólicos (Wettasinghe & Shahidi, 1999).

Os compostos fenólicos presentes nas plantas são sintetizados tipicamente durante o seu desenvolvimento como mecanismo de protecção contra condições adversas tais como lesões dos tecidos, infecções e radiação UV. A sua estrutura base apresenta um anel aromático ao qual pode estar ligado um grupo hidroxilo (fenóis) ou vários (polifenóis), o que origina uma grande diversidade de compostos. Os compostos fenólicos podem ser divididos em várias classes, destacando-se os ácidos fenólicos, flavonóides e taninos, como antioxidantes fenólicos mais disseminados na natureza (Angelo & Jorge, 2007). Os ácidos fenólicos que ocorrem naturalmente nas plantas são constituídos por dois grupos, os ácidos hidroxibenzóicos e seus derivados (com estrutura comum C₆-C₁) e os ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados, com estrutura base C₆-C₃, cujos compostos mais frequentes encontram-se representados na Tabela 0.1 (Shahidi & Naczki, 2005) (Stalikas, 2007). Os flavonóides apresentam estrutura base C₆-C₃-C₆, formada por dois anéis fenólicos ligados entre si através de um anel pirano (Angelo & Jorge, 2007) (Stalikas, 2007).

A divisão dos compostos fenólicos pode ainda ser feita em dois grandes grupos: pouco distribuídos na natureza e amplamente distribuídos na natureza. De um modo geral, pertencem ao primeiro grupo os fenóis simples, enquanto no segundo grupo são incluídos todos os compostos fenólicos (*e.g.* ácidos fenólicos, flavonóides e taninos) presentes no reino vegetal (Soares, 2002).

Tabela 0.1 – Exemplos de estruturas dos ácidos fenólicos

Ácidos Hidroxibenzóicos		Estruturas mais comuns			
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
	Ácido benzóico	H	H	H	H
	Ácido vanílico	H	OCH ₃	OH	H
	Ácido gálico	H	OH	OH	OH
	Ácido protocatéquico	H	OH	OH	H
	Ácido siríngico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Ácidos Hidroxicinâmicos					
	Ácido cinâmico	H	H	H	H
	Ácido <i>o</i> -cumárico	OH	H	H	H
	Ácido ferúlico	H	OCH ₃	OH	H
	Ácido sinápico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
	Ácido cafeíco	H	OH	OH	H

Os compostos fenólicos são considerados antioxidantes e podem ser incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da auto-oxidação. Os flavonóides e os ácidos fenólicos são os que mais se destacam do grupo dos compostos fenólicos (Shahidi, Janitha, & Wanasundara, 1992) (Adegoke, Vijay Kumar, Gopala Krishna, Varadaraj, Sambaiah, & Lokesh, 1998) (Broinizi, et al., 2007). A eficiência antioxidante é determinada pelos grupos funcionais presentes e pela posição que ocupam no anel aromático, bem como pelo tamanho da cadeia desses grupos (Shahidi, Janitha, & Wanasundara, 1992) (Ferrari, 1998).

1.2.3. ANTIOXIDANTES NA SAÚDE, ALIMENTAÇÃO E INDÚSTRIA ALIMENTAR

Estudos epidemiológicos efectuados nas últimas décadas apontam para que os antioxidantes apresentem efeitos benéficos na prevenção ou redução de incidência de várias doenças, devido à sua acção anticancerígena e antimutagénica (Benavente-Garcia, 1999). A actividade anticarcinogénica dos compostos fenólicos tem sido relacionada com a inibição dos cancros de

cólon, esófago, pulmão, fígado, mama e pele (Pimentel, Francki, & Gollücke, 2005) (Lidon & Silvestre, 2010). Outros exemplos de doenças prevenidas ou cujo risco de incidência é diminuído são as doenças cardiovasculares, diabetes, doenças coronárias, doenças crónicas dos pulmões, fibroses pulmonares, arteriosclerose e envelhecimento precoce (Namiki, 1990) (Bravo, 1998) (Ramarathnam, Osawa, Ochi, & Kawakishi, 1995) (Lidon & Silvestre, 2010).

Moureu e Dufraise estudaram as propriedades de vários produtos químicos com potencial para prevenir a oxidação de gorduras e de alimentos com elevado teor de lípidos, tendo analisado a actividade antioxidante de mais de 500 compostos. Esta investigação despoletou uma procura de aditivos químicos com capacidades para controlarem a oxidação que ocorre em praticamente todas as etapas da produção de alimentos com gordura. Contudo, apesar de terem sido testados centenas de compostos para inibir a deterioração oxidativa, apenas alguns dos que apresentaram actividade elevada podem ser adicionados em produtos para consumo humano (Shahidi F., 1996a).

Quando se trata da aplicação de antioxidantes na indústria alimentar, existem algumas propriedades que têm de ser consideradas, tais como: eficácia a baixas concentrações (abaixo de 0,02% w/w), porque a altas concentrações podem actuar como pró-oxidantes ou apresentar outro tipo de toxicidade; ausência de efeitos indesejáveis nas características sensoriais (*e.g.* cor, odor e sabor) e noutras características do alimento (*e.g.* textura e viscosidade); compatibilidade com o alimento e fácil aplicação; estabilidade nas condições de fabrico e armazenamento (especialmente sob temperaturas elevadas), e os compostos dos seus produtos de oxidação não podem ser tóxicos (Shahidi F., 1996a). Na escolha de um antioxidante é ainda necessário ter em conta outros factores, como a legislação em vigor, o custo inerente e a preferência do consumidor por antioxidantes naturais (Broinizi, et al., 2007).

1.3. CARACTERIZAÇÃO DA CORTIÇA

1.3.1. *QUERCUS SUBER*

A Taxonomia de Lineu (Carlos Lineu, séc. XVIII) baptizou o sobreiro com o nome latim *Quercus suber*, que é uma árvore que se supõe existir há cerca de 30 milhões de anos, pertencendo à família das Fagáceas e ao género *Quercus* (Ministério da Agricultura, 2000).

A cortiça, produzida em equilíbrio com a natureza no âmbito de um dos mais ricos, complexos e estáveis ecossistemas das regiões mediterrâneas, vem demonstrando a sua inesgotável utilidade enquanto matéria-prima renovável de características inigualáveis e insubstituíveis. Segundo a Norma Portuguesa 1705 (1995) a cortiça pode ser definida como sendo “*um parênquima suberoso originado pelo meristema súbero-felodérmico do sobreiro, constituindo o revestimento do seu tronco e ramos*”, sendo um produto 100% natural e totalmente renovável. A capacidade que o sobreiro apresenta de regeneração da cortiça distinguem-no das restantes árvores da sua espécie, sendo que a sua vida varia entre os 170 e os 200 anos, sofrendo 15 a 18 descortiçamentos durante este período (Ministério da Agricultura, 2000).

A cortiça apresenta excelentes propriedades, destacando-se a leveza, fluviabilidade, elasticidade, compressibilidade, impermeabilidade, isolamento acústico, térmico e mecânico (devido ao ar que se encontra encerrado em minúsculos compartimentos estanques, isolados por um material de baixa densidade e que não é higroscópico). A cortiça é ainda um material inodoro, retardador de combustão, compacto, renovável, reciclável, biodegradável e resistente. Esta combinação de características leva a que seja aplicada em vários sectores de actividade, nomeadamente, vinícola, construção civil, indústria automóvel, pesca, calçado, vestuário, entre outros (Natividade, 1934) (Cortiça - suplemento ao Boletim Cortiça N.º 600, 1988) (Ministério da Agricultura, 2000) (Machado, 2005).

1.3.2. MORFOLOGIA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Desde o século XVII que a estrutura da cortiça foi considerada como sendo alveolar, tendo sido um dos primeiros tecidos vegetais a ser observado ao microscópio por Hooke em 1664 (Cortiça - suplemento ao Boletim Cortiça N.º 600, 1988) (Silva, Sabino, Fernandes, Correlo, & Boesel, 2005). A cortiça é constituída por células mortas, dispostas de forma compacta e regular, sem

espaços livres e que apresentam dimensões diminutas com a forma de um prisma recto com secção pentagonal ou hexagonal, encontrando-se unidas pela base e dispostas em fiadas paralelas, segundo o eixo radial da árvore, e com parede celular lateral ondulada (Figura 0.1) (Cortiça - suplemento ao Boletim Cortiça N.º 600, 1988) (Silva M. , 2010).

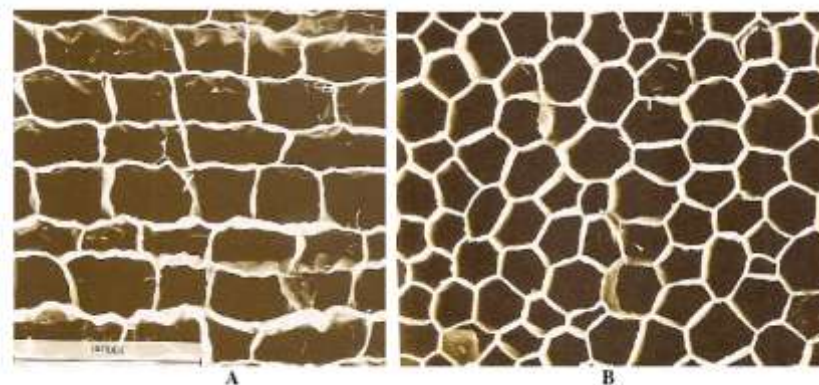


Figura 0.1 – Célula da cortiça: A) Corte transversal; B) Corte tangencial (*in* Silva M., 2010)

Relativamente à composição química da cortiça, os estudos iniciais foram efectuados por Brugnatelli em 1787 que, depois de submeter a cortiça a um tratamento com ácido nítrico, obteve um produto que denominou ácido subérico. Em 1815, o químico francês Chevreul após extrair a cortiça com diversos solventes obteve uma substância que não se dissolvia nem em água nem em álcool, a que deu o nome de suberina (Cortiça - suplemento ao Boletim Cortiça N.º 600, 1988).

Quimicamente a cortiça é constituída por vários tipos de compostos, que são tradicionalmente divididos da seguinte forma: suberina ($\approx 45\%$); lenhina ($\approx 27\%$); polissacáridos ($\approx 12\%$); ceras ($\approx 6\%$) e taninos ($\approx 6\%$) (APCOR, <http://www.apcor.pt/>). Contudo, os valores apresentados são muito variáveis, sendo a composição da cortiça influenciada pela origem geográfica, condições edafoclimáticas, idade e dimensão da árvore, ou até pelas diferentes partes da árvore da qual a cortiça foi colhida (Pinto, et al., 2009).

As células do tecido suberoso, o tecido maioritário da cortiça, são originadas pela divisão sucessiva das células da felogene (camada de células mais interna). Após a divisão, estas células diferenciam-se da felogene dando origem à parede celular suberificada (Silva, Sabino, Fernandes, Correlo, & Boesel, 2005). O tecido suberoso é constituído por componentes estruturais e extractivos. Os componentes estruturais estão relacionados com as funções de estrutura e suporte e incluem celulose, hemicelulose, lenhina, suberina e polissacáridos. No que diz respeito aos extractivos, representam o conjunto de substâncias que podem ser dissolvidas utilizando solventes orgânicos ou aquosos, incluindo ceras (reforço de impermeabilização) e

fracção fenólica e polifenólica (possível efeito de protecção contra ataques por organismos biológicos) (Silva, Sabino, Fernandes, Correlo, & Boesel, 2005) (Silva M. , 2010).

Silva, et al. (2005), sugerem que a estrutura celular da parede da cortiça consiste numa fina camada maioritariamente constituída por lenhina (parede primária interna), denominada por lamela média; numa espessa parede secundária constituída alternadamente por lamelas de cera e suberina; e numa fina parede terciária composta por polissacáridos (Figura 0.2).

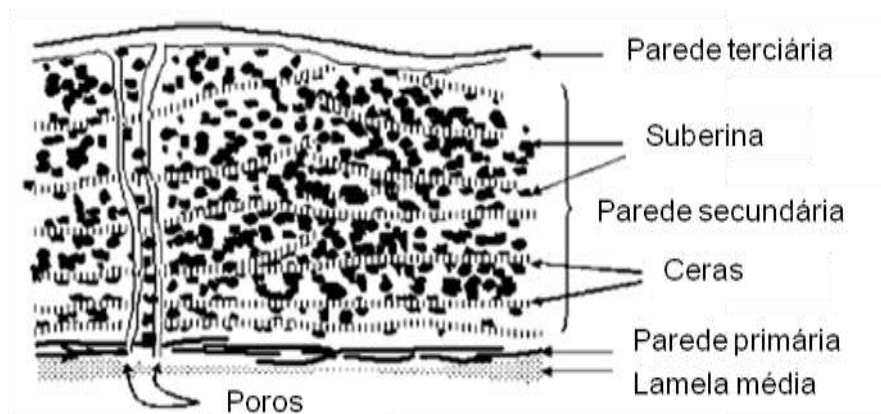


Figura 0.2 – Estrutura celular da parede da cortiça (adaptado de Silva, et al., 2005)

A suberina, o principal polímero que constitui a cortiça, é uma estrutura química complexa que tem vindo a ser alvo de estudo ao longo dos anos. Pinto e colaboradores (2009) sugerem que os principais constituintes da suberina são o glicerol, α,ω -diácidos, α -hidroxiácidos e compostos aromáticos, com especial expressão o ácido ferúlico.

1.3.3. INDÚSTRIA CORTICEIRA

A indústria de produção e transformação de cortiça é o único sector de actividade nacional em que Portugal é líder mundial, assumindo um papel fulcral na nossa economia.

Embora não se conheça com rigor a área mundial ocupada pelo sobreiro, estima-se que seja próxima de 2,3 milhões de hectares e que se encontre, principalmente, na bacia Ocidental do Mediterrâneo (Figura 0.3). Em Portugal concentra-se 32% da área mundial, seguindo-se Espanha, alguns países do Norte de África (Marrocos, Argélia e Tunísia), França e Itália (Ministério da Agricultura, 2000) (APCOR, APCOR anuário, 2009).



Figura 0.3 – Distribuição do montado de sobreiro pelo Mediterrâneo

As condições edafoclimáticas portuguesas são propícias ao desenvolvimento do sobreiro que representa 23% da área total da floresta nacional. A mais vasta área do montado de sobreiro portuguesa localiza-se na região do Alentejo, seguida de Lisboa e Vale do Tejo, Algarve, Centro e Norte (APCOR anuário, 2009).

Segundo os dados do Instituto Nacional de Estatística (INE), a indústria corticeira distribui-se por doze distritos, mas apenas os distritos de Aveiro (concelho de Santa Maria da Feira) e Setúbal são significativos, sendo responsáveis por cerca de 75 e 13%, respectivamente, do emprego nesta indústria. Existem aproximadamente 800 empresas a operar no sector da cortiça português, que produzem cerca de 40 milhões de rolhas por dia (35 milhões das quais no Norte do país), e que empregam cerca de doze mil operários (Boletim mensal de Actividade Económica, 2007).

Relativamente às exportações nacionais, aproximadamente 90% da cortiça transformada em Portugal tem como destino o mercado internacional, representando uma importante fonte de proveitos para o nosso país. No ano de 2008, os ganhos ascenderam aos 823,7 milhões de euros, correspondentes a 159 mil toneladas de produtos exportados (APCOR anuário, 2009). Portugal é ainda o maior importador mundial de cortiça, utilizada para transformação e posterior exportação sob a forma de produtos acabados. Em 2008, as importações atingiram 129 milhões de euros e 59 milhares de toneladas (APCOR anuário, 2009). As importações do sector da cortiça são provenientes, essencialmente, de Espanha.

Ao nível da produção mundial de cortiça (que ascende anualmente a valores próximos das 300 mil toneladas), 52% tem proveniência portuguesa (mais de 150 mil toneladas anuais) (Tabela 0.2), o que mostra a liderança mundial de Portugal no sector (APCOR anuário, 2009).

Tabela 0.2 – Produção de cortiça em 2007

País	Percentagem (%)
Portugal	52,5
Espanha	29,5
Itália	5,5
Argélia	5,2
Marrocos	3,7
Tunísia	2,5
França	1,1

A rolha de cortiça e todo o seu processo de transformação, desde o montado até ao produto final, são um exemplo de indústria sustentável que assegura a preservação do ecossistema. No que se refere ao montado, destacam-se a conservação dos solos, a regulação do ciclo de água, a fixação do carbono e a conservação da biodiversidade. As rolhas apresentam baixas emissões de dióxido de carbono e são 100% recicláveis (APCOR anuário, 2009).

1.3.4. FABRICOR

A Fabricor, Indústria, Preparação e Transformação de Cortiça S.A., situa-se em Alcochete e dedica-se exclusivamente à produção de produtos de cortiça (*e.g.* rolhas, pranchas, granulado, discos e bastões) e distribuição dos seus produtos, pelos mercados interno e externo. A Fabricor factura mais de 12 milhões de euros por ano e exporta 50% da sua produção (<http://www.fabricor.pt/>). Na Figura 0.4 está representado o esquema de produção seguido nesta empresa para a rolha de cortiça natural.

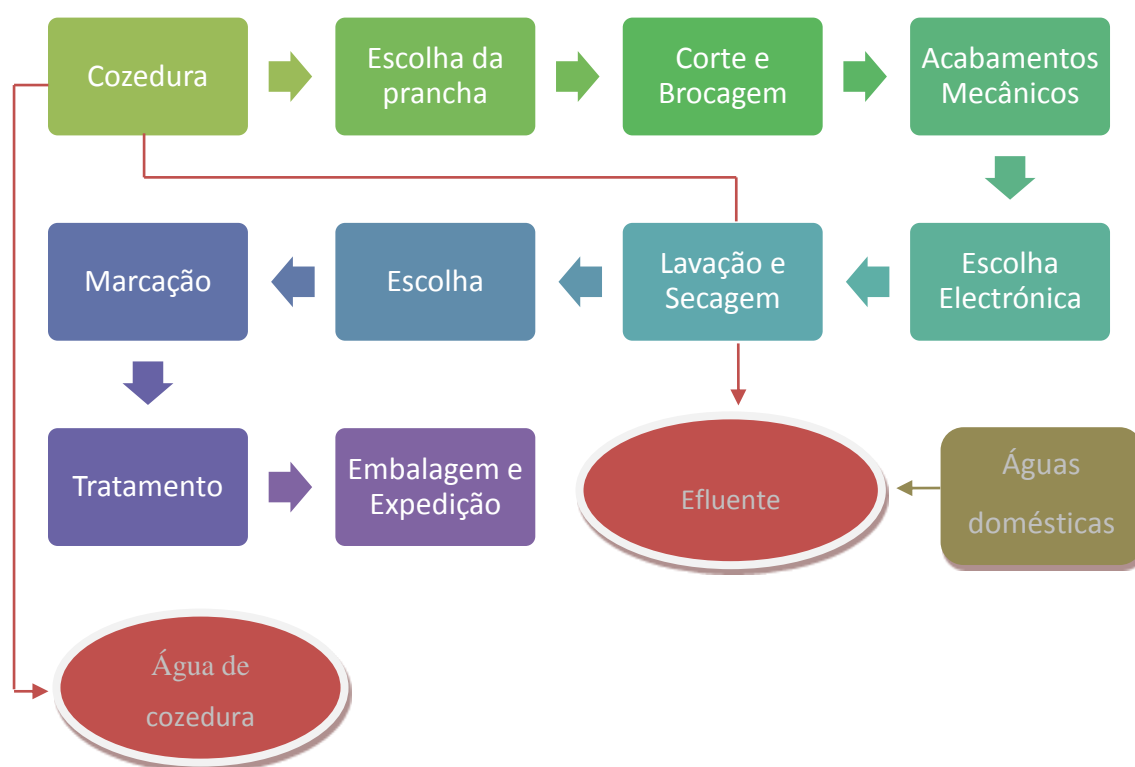


Figura 0.4 – Fluxograma do fabrico de rolhas de cortiça e locais de saída de águas de processo (adaptado de <http://www.fabricor.pt/>)

Os efluentes originados por esta indústria provêm de todo o processo de industrial, incluindo as águas de cozedura e da lavagem e secagem das rolhas de cortiça.

1.3.4.1. ÁGUA DE COZEDURA

A cozedura da cortiça é efectuada com o objectivo de melhorar as propriedades das pranchas, tornando-as mais flexíveis e suaves, e remover impurezas (*e.g.* organismos vivos) (Geraldes, et al., 2009).

Na indústria corticeira em estudo, o processo de cozedura das pranchas de cortiça é realizado em dois tanques abertos, a aproximadamente 100 °C, durante cerca de 1 hora. A cada dia de produção são processadas 22 toneladas de prancha de cortiça, sendo que a mesma água é utilizada durante 3 dias. Para minimizar a carga orgânica e resíduos sólidos da água de cozedura, esta é submetida a um processo de filtração a cada 4 toneladas de prancha.

A água originada pelo processo de cozedura das pranchas de cortiça apresenta uma composição complexa (Machado, 2005). O seu encaminhamento para o meio receptor sem tratamento prévio

é problemático devido à grande variedade de compostos orgânicos e fenólicos dissolvidos, cor característica (castanho escuro), baixo pH, elevada toxicidade (dos compostos fenólicos), baixa biodegradabilidade e elevada temperatura (Machado, 2005) (Bernardo, Santos, Cantinho, & Minhalma, 2011). Usualmente os efluentes gerados por este tipo de indústria apresentam também valores elevados de Sólidos Suspensos Totais (SST), Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO) e Carência Química de Oxigénio (CQO), bem como cheiro e cor intensos (Minhalma & Pinho, 2001a) (Guedes, Madeira, Boaventura, & Costa, 2003) (Peres, Heredia, & Domínguez, 2004) (Silva, Madeira, Boaventura, & Costa, 2004) (Machado, 2005).

Como foi referido anteriormente, as águas de cozedura de cortiça são misturas complexas de extractos vegetais, que apresentam concentrações elevadas de compostos fenólicos tais como ácidos fenólicos, taninos, 2,4,6-tricloroanisol (TCA), pentaclorofenol, ácido benzóico e ácidos cinâmicos (Benítez, Acero, & Leal, 2008). Segundo Minhalma e Pinho (2001a) os ácidos fenólicos que existem em maior quantidade na água de cozedura de cortiça são os ácidos gálico, protocatéquico, vanílico, siríngico, ferúlico e elágico.

1.3.4.2. EFLUENTE BRUTO

O efluente bruto é constituído por toda a água do processo: água da cozedura das pranchas de cortiça; lavagem e secagem das rolhas e águas domésticas (balneários, refeitório e casa de habitação). Após a mistura destas águas, o efluente bruto segue para a ETAR (Estação de Tratamento de Águas e Resíduos), onde é sujeito a tratamento químico, arejamento e decantação antes de ser encaminhado para um curso de água.

O maior contributo das águas de processo para a composição do efluente bruto provém da água de cozedura das pranchas de cortiça, pelo que este efluente apresenta elevadas temperaturas ($\approx 90\text{ }^{\circ}\text{C}$) à entrada da ETAR.

1.4. VALORIZAÇÃO DE EFLUENTES DA INDÚSTRIA CORTICEIRA COMO FONTES DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

A indústria corticeira encontra-se fortemente implementada em Portugal, apresentando um elevado volume de produção. De cada lote de pranchas de cortiça que são cozidas, resultam elevadas quantidades de água, que têm que ser tratadas antes de serem encaminhadas para os cursos de água e que representam um elevado custo para esta indústria. A presença de compostos fenólicos nestas águas dificulta o seu tratamento biológico e químico, visto apresentarem moléculas de elevada complexidade difíceis de degradar (*e.g.* ácido tânico), baixo pH e compostos com toxicidade relativamente aos microrganismos utilizados no tratamento biológico, limitando a sua biodegradabilidade (Minhalma & Pinho, 2001a) (Minhalma & Pinho, 2001b) (Mendonça, Pereira, Martins, & Anselmo, 2004) (Acero, Benitez, Leal, & Real, 2005) (Dias-Machado, Madeira, Nogales, Nunes, & Manaia, 2006) (Teixeira, Santos, & Crespo, 2009). O conteúdo fenólico torna-se ainda problemático para a fauna e flora do meio receptor, estando descrito o efeito letal em peixes para concentrações na ordem dos 6-7 mg/L de fenol, e a presença de polifenóis impede a circulação de fósforo e azoto, bem como a mineralização da matéria orgânica nos solos (Alkan, A. & Sengul, F. *in* (Geraldes, et al., 2009)).

Estudos portugueses e espanhóis efectuados na última década nesta área focam-se, essencialmente, no cumprimento da legislação em vigor. As suas propostas assentam no tratamento das águas de processo recorrendo a tratamentos químicos (*e.g.* oxidação química, processos fotoquímicos e precipitação química) e biológicos (*e.g.* sistema de lamas activadas e biodegradação pela flora natural) com capacidade de degradar a matéria orgânica existente (Benitez, Acero, Garcia, & Leal, 2003) (Guedes, Madeira, Boaventura, & Costa, 2003) (Mendonça, Pereira, Martins, & Anselmo, 2004) (Peres, Heredia, & Domínguez, 2004) (Silva, Madeira, Boaventura, & Costa, 2004) (Acero, Benitez, Leal, & Real, 2005) (Benitez, Real, Acero, Leal, & Garcia, 2005) (Dias-Machado, Madeira, Nogales, Nunes, & Manaia, 2006) (Pintor, Vilar, & Boaventura, 2011).

A Associação Portuguesa de Cortiça (APCOR) e a Associação Portuguesa dos Industriais de Curtumes (APIC), criaram um programa denominado Reciclar, que tem como principais objectivos tratar e valorizar os resíduos provenientes da indústria corticeira, de modo a garantir uma correcta gestão ambiental dos efluentes gerados, sem geração de lamas e aliciando a indústria para o cumprimento da legislação ambiental em vigor (Directiva do Conselho 91/271/CEE, 1991), e transformando os resíduos num produto subsidiário, com vista à sua

aplicação por parte da indústria dos curtumes. O objectivo é obter um concentrado do conteúdo fenólico destas águas, através de técnicas de separação por membranas (*e.g.* nanofiltração ou ultrafiltração), que será modificado recorrendo a técnicas químicas e biológicas para que possa ser aplicado na indústria de curtumes, substituindo, assim, os taninos comerciais adquiridos por importação (APCOR, <http://www.apcor.pt/>) (Benítez, Acero, & Leal, 2008) (Teixeira, Santos, & Crespo, 2009). O uso de taninos naturais na indústria de produção de couro pode conduzir à produção de couro com ausência de crómio e de elevada qualidade (Ciesla, 2002).

O reaproveitamento do conteúdo fenólico presente nas águas de cozedura das pranchas de cortiça permite à indústria corticeira minimizar os custos do tratamento de efluentes, obter um produto com valor comercial representando uma fonte de receita e melhorar a eficácia do tratamento biológico. No caso da indústria dos curtumes produzirá um produto totalmente nacional e de elevada qualidade e aumentará a competitividade de ambos os sectores (APCOR, <http://www.apcor.pt/>). Teixeira, et al. (2009) têm desenvolvido trabalho no sentido da extracção de compostos fenólicos das águas de cozedura através da aplicação de membranas específicas levando à possível reutilização dos efluentes.

Com o presente trabalho pretendeu-se conhecer melhor a composição fenólica das águas originadas pelo processamento da cortiça na empresa Fabricor, bem como a sua actividade antioxidante, de modo a avaliar a sua possível valorização como fonte de antioxidantes naturais e desta forma melhorar a sustentabilidade da empresa através de uma redução das suas emissões para o meio receptor e reciclagem dos resíduos produzidos.

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

2.1. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os cálculos e tratamento estatístico dos dados obtidos foram efectuados através do software Origin®, Excel® e SPSS®.

O tratamento estatístico dos resultados obtidos para todas as metodologias foi realizado através da aplicação das seguintes equações:

Média aritmética

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} \quad [0.1]$$

Desvio padrão

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}} \quad [0.2]$$

Erro padrão da média

$$EPM = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad [0.3]$$

Coefficiente de correlação de Pearson

$$R = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \sqrt{n \sum y^2 - (\sum y)^2}} \quad [0.4]$$

Em que n corresponde ao número de réplicas efectuadas.

Os resultados neste trabalho são apresentados do seguinte modo: $\bar{x} \pm EPM$, sempre que $n \geq 2$.

2.2. AMOSTRAGEM

As amostras analisadas neste estudo foram recolhidas em dois locais: 1) no tanque da cozedura da cortiça (água de cozedura) e 2) à entrada da estação de tratamento de águas residuais (efluente bruto), na Fabricor – Indústria de Preparação e Transformação de Cortiça, S.A.. Foram realizadas recolhas pontuais de 2,5 L, no final da cozedura de 22 toneladas de prancha de cortiça de modo a garantir a máxima concentração de antioxidantes, para cada uma das amostras em

estudo em recipientes próprios, previamente tratados de modo a garantir a ausência de resíduos químicos e biológicos. As amostras foram analisadas o mais breve possível no Laboratório de Ensaios Tecnológicos em Áreas Limpas (LETAL), situado no *campus* do Instituto Tecnológico e Nuclear (ITN).

2.3. PARÂMETROS ANALISADOS

A avaliação dos antioxidantes presentes nas águas de processo da indústria corticeira baseou-se na caracterização físico-química das amostras através da determinação dos parâmetros CQO, CBO, COT e pH; na caracterização e quantificação dos principais antioxidantes presentes através de técnicas cromatográficas (HPLC-DAD), técnicas espectrométricas (ESI-MS) e métodos colorimétricos de determinação de fenólicos totais (reacção de Folin-Ciocalteu); e ainda na avaliação do poder antioxidante por três métodos distintos (nomeadamente reacção de sequestração do radical DPPH[•], sequestração do radical anião superóxido por fotoquimioluminescência e poder redutor férrico (FRAP)). Apresenta-se seguidamente uma descrição destes métodos.

2.3.1. CARÊNCIA QUÍMICA DE OXIGÉNIO

PRINCÍPIO DO MÉTODO

A carência química de oxigénio (CQO) determina a quantidade de matéria orgânica presente na amostra susceptível de ser oxidada quimicamente. A CQO foi avaliada de acordo com o *Standard Methods* (Clesceri, Greenberg, & Eaton, 1998 – Método nº 5220C). A amostra é tratada com um excesso de mistura cromo-sulfúrica (solução de dicromato de potássio, K₂Cr₂O₇, em ácido sulfúrico, H₂SO₄) e submetida a aquecimento em refluxo até ocorrer a oxidação da matéria orgânica. Após esta digestão, o dicromato de potássio que não reagiu é titulado com sulfato de amónio ferroso (FAS) para se determinar a quantidade de dicromato de potássio consumido, sendo a matéria oxidável calculada em equivalentes de oxigénio. A digestão poderá decorrer num tempo inferior a duas horas se se tiver demonstrado que com períodos mais curtos os resultados obtidos são semelhantes.

Algumas amostras com baixa CQO ou com elevada carga de sólidos heterogéneos podem necessitar que se efectuem análises múltiplas para determinar valores mais representativos.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

No início de cada sessão experimental, procedeu-se à padronização da solução titulante de sulfato de amónio ferroso (FAS) (0,12 mol/L) através da diluição de 10 mL de solução de dicromato de potássio (0,04 mol/L) contendo um sal de mercúrio, com cerca de 100 mL de solução de ácido sulfúrico a 20 % para um balão erlenmeyer de 250 mL. Titulou-se a solução anterior com a solução titulante de FAS, na presença de 2 gotas de ferroína (solução indicadora). O ponto de equivalência foi observado pela viragem da solução titulada de azul esverdeado para castanho avermelhado.

A digestão da amostra foi efectuada em tubos de reacção (Merck, 10 mL) com tampa sólida, descontaminados com uma solução de ácido sulfúrico a 20% para remover possíveis resíduos de matéria orgânica que poderiam originar interferências. A mistura reaccional consistiu em 3,5 mL de solução de ácido sulfúrico – sulfato de prata a 1%, 1,5 mL de solução de dicromato de potássio com sal de mercúrio e 2,5 mL da amostra diluída. Paralelamente, realizou-se um ensaio em branco com água ultra pura (Milli-Q). A mistura reaccional foi homogeneizada com um vórtex (Heidolph, model Reax Top) e aquecida a 148 °C durante 3h utilizando um reator térmico (Thermoreactor TR 300, Merck). Dado o carácter extremamente corrosivo da mistura reaccional é essencial garantir a estanquicidade dos tubos durante todo o procedimento e em particular colocar no reator térmico uma cobertura de segurança. Após o período de digestão (3h), e quando os tubos de reacção atingiram a temperatura ambiente, transferiu-se o seu conteúdo para copos de precipitação e titulou-se o excesso de dicromato de potássio com a solução FAS, na presença de 1 gota de ferroína, até viragem para castanho avermelhado. Os ensaios foram realizados em triplicado, aplicando um factor de diluição às amostras.

O cálculo da CQO (Anexo I) é realizado mediante a equação [2.5] em que A corresponde ao volume, em mL, da solução de FAS gasto na titulação do branco, B é o volume, em mL, da solução de FAS gasto na titulação da amostra, C corresponde à concentração da solução titulante, δ é o número de miliequivalentes em massa de oxigénio atómico ($PEq = \frac{M(O_2)}{h}$, onde $M(O_2)$ é a massa molar de O_2 e h o número de átomos envolvidos na reacção), multiplicado por 1000 (para obter unidades de CQO em mgO_2/L).

$$CQO (mgO_2/L) = \frac{(A-B) \times C \times 8000}{Volume_{amostra}} \quad [0.5]$$

CORRECÇÃO DO VALOR EXPERIMENTAL DA CQO UTILIZANDO UM PADRÃO DE CQO CONHECIDA (VALOR TEÓRICO)

A determinação experimental da CQO pode ser afectada por erros experimentais sistemáticos que ocorrem tanto com as amostras como com as soluções-padrão. Para minimizar este tipo de erros efectuou-se uma série de determinações da CQO de soluções-padrão de hidrogenoftalato de potássio (KHP), cujos valores de CQO teóricos (Anexo I) foram determinados com base no método nº 5220 C (Clesceri, Greenberg, & Eaton, 1998). O protocolo seguido foi idêntico ao descrito para as amostras e os valores experimentais obtidos nestas determinações foram representados em função dos valores teóricos. Observou-se uma forte relação linear (coeficiente de correlação, $R = 0,999$) entre o valor experimental (CQO_{exp}) e o valor teórico ou corrigido (CQO_{teo}); a equação [2.6] que descreve esta relação linear foi utilizada para corrigir o valor de CQO experimental determinado para cada amostra e apresenta-se a seguir:

$$CQO_{teo} = 1,044 CQO_{exp} + 15,744 \quad [0.6]$$

2.3.2. CARÊNCIA BIOQUÍMICA DE OXIGÉNIO

PRINCÍPIO DO MÉTODO

A carência bioquímica de oxigénio (CBO) permite avaliar a concentração de compostos biodegradáveis presentes na amostra. A CBO foi avaliada de acordo com o *Standard Methods* (Clesceri, Greenberg, & Eaton, 1998 – Método nº 5210B). Este método consiste na determinação da concentração de oxigénio dissolvido na amostra, a cada 24 horas, à temperatura de 20 ± 1 °C, durante 5 dias.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os frascos de CBO foram esterilizados durante 20 minutos, a 125 °C, por calor húmido (autoclave horizontal Steri 21). Em seguida, colocou-se no frasco o volume de amostra correspondente ao intervalo de CBO esperado (*e.g.* 157 mL para um intervalo de 0–400 mgO₂/L), cuja tabela de correspondências é fornecida pelo fabricante deste equipamento (BOD-System OxiDirect®, Aqualytic®), e adicionaram-se as gotas correspondentes de inibidor de nitrificação (Allyl Thiourea - ATH), bem como um agitador magnético. Foram ainda colocadas 3 gotas da solução de hidróxido de potássio a 45% nos cestos (para absorção do CO₂ produzido)

e, seguidamente, apertaram-se bem os frascos com o oxímetro. Encaixaram-se os frascos de CBO e respectivos sensores no equipamento de leitura (BOD-System OxiDirect[®], Aqualytic[®]). Por último, colocaram-se as amostras a incubar durante cinco dias a 20 ± 1 °C. Todas as etapas do procedimento experimental foram realizadas no interior da câmara de fluxo laminar horizontal (Esco[®]), de modo a minimizar contaminações cruzadas. A determinação da CBO é efectuada automaticamente pelo equipamento através do oxímetro existente em cada frasco, que mede o oxigénio consumido durante um período de incubação estipulado.

2.3.3. CARBONO ORGÂNICO TOTAL

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O princípio da técnica consiste na combustão de moléculas orgânicas e inorgânicas, a alta temperatura, sendo quantificado o dióxido de carbono (CO_2) produzido em diferentes condições de oxidação. O valor do Carbono Orgânico Total (COT) é determinado pela diferença entre o Carbono Total (CT) e o Carbono Inorgânico Total (CIT). Na determinação do CT injecta-se a amostra acidificada (com 2 M HCl) no forno catalítico onde toda a matéria orgânica e inorgânica é completamente oxidada a dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O), que são arrastados por um gás inerte até um detector de infravermelhos não dispersível (Non-Dispersive InfraRed – NDIR). A concentração de CO_2 é medida várias vezes a cada segundo e o NDIR gera um sinal que é proporcional à concentração do carbono existente na amostra, o qual é registado sob a forma de um pico (sendo a concentração de carbono proporcional à área do pico). O conteúdo em carbono é determinado através de uma curva de calibração previamente efectuada.

Na determinação do CIT a amostra é injectada directamente num tubo reactor onde reage com uma solução de ácido fosfórico (H_3PO_4 – 10 %), ocorrendo apenas a conversão do carbono inorgânico em CO_2 . Os produtos da reacção são arrastados pelo gás inerte para uma armadilha onde são retidos os componentes líquidos (não oxidados), enquanto os produtos gasosos, nomeadamente o CO_2 , é conduzido para o NDIR. Determina-se o CIT da amostra, recorrendo à mesma recta de calibração utilizada na determinação do CT.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O Carbono Orgânico Total (COT) foi determinado num Analisador IL550 TOC-TN (Hach-Lange), no módulo de líquidos, com um volume de injeção de amostra de 100 μL e temperatura do reactor de 800°C. Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.3.4. DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (REACÇÃO DE FOLIN-CIOCALTEU)

PRINCÍPIO DO MÉTODO

A quantificação dos compostos fenólicos totais presentes nas amostras em estudo foi realizada através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002). O método baseia-se na redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, presentes no reagente de Folin-Ciocalteu pelos compostos fenólicos presentes na amostra, produzindo um complexo de coloração azul que absorve a 765 nm, passando a amarelo após reacção, permitindo a quantificação das substâncias redutoras. A reacção ocorre em meio alcalino que se obtém por adição de uma solução de carbonato de sódio (2 M).

O método de Folin-Ciocalteu não é um método específico, pois determina todos os fenólicos presentes, além de substâncias redutoras adicionadas ou naturalmente presentes e que podem assim interferir com os resultados obtidos.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Misturaram-se numa célula de vidro 20 μL da amostra, 1,58 mL de água ultra pura e 100 μL do reagente Folin-Ciocalteu (2N) (Ref. 19058, BDH®). Homogeneizou-se a solução e deixou-se em repouso durante cinco minutos. Seguidamente adicionaram-se 300 μL de solução de carbonato de sódio, homogeneizou-se e deixou-se em repouso durante duas horas a $\pm 20^\circ\text{C}$, ao abrigo da luz, para ocorrer a redução dos compostos fenólicos presentes e consequente desenvolvimento

da cor. Após o tempo decorrido, foram lidas as absorvâncias a 765 nm contra o branco (substituição do volume de amostra por água ultra pura).

O teor de compostos fenólicos presentes na amostra (expresso em equivalentes de ácido gálico) foi determinado utilizando uma recta de calibração construída com soluções-padrão de ácido gálico em água com concentrações entre 0 e 3 mM, que foram analisadas de acordo com protocolo que foi aplicado às amostras.

Obteve-se uma relação linear ($R = 0,997$) entre a absorvância das soluções-padrão de ácido gálico a 765 nm após a reacção com o reagente de Folin-Ciocalteu e a sua concentração expressa em milimoles/L (Anexo II A), que se pode traduzir pela equação [2.7].

$$Abs(765\text{ nm}) = 0,163 \times c_{ag} + 0,025 \quad [0.7]$$

em que c_{ag} corresponde à concentração de ácido gálico em mM.

À concentração de compostos fenólicos totais obtida a partir da recta de calibração foi aplicado um factor multiplicativo correspondente ao factor de diluição ao qual foi sujeita a amostra (Anexo II A). Os ensaios foram efectuados em triplicado.

2.3.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

PRINCÍPIO DO MÉTODO

A cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) é uma técnica analítica de separação e quantificação de compostos químicos. O equipamento de HPLC (Prominence, Shimadzu®) é composto por cinco módulos: controlador (CBM-20A), unidade de gradientes de baixa pressão (DGU-20A5), unidade de solventes (LC20AD), detector de rede de díodos (SPD-M20A) e forno da coluna (CTO-20AC). O seu princípio de funcionamento assenta na diferença de afinidades dos compostos injectados no sistema com duas fases imiscíveis – a fase móvel (eluente) e a fase estacionária (enchimento da coluna).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Nas análises cromatográficas efectuadas injectaram-se, à temperatura ambiente, 20 µL das soluções em estudo (compostos padrão e amostras), numa coluna de fase reversa Tracer Excel 120 ODS-B (Teknokroma), de 25cm × 0,4cm, com um diâmetro de partículas de 5 µm. A eluição foi efectuada com um sistema binário de solventes (solvente A = ácido fosfórico a 0,5 % e solvente B = acetonitrilo), utilizando um fluxo de fase móvel de 0,8 mL/min. A composição da fase móvel foi variável tendo sido programada através do seguinte gradiente: 2% B (5 min), 2% a 15% B (10 min); 15% B (3 min); 15% a 50% B (4 min); 50% B (5 min); 50% a 2% B (3 min); 2% B (5 min). A detecção foi realizada entre 200 e 400 nm; o tempo máximo de corrida foi de 35 minutos e a pressão máxima de 250 bar.

A tentativa de identificação da presença dos compostos em estudo foi efectuada por comparação do tempo de retenção e espectro de absorvância de cada pico cromatográfico com padrões autênticos de ácido gálico, hidroquinona e ácido ferúlico, nomeadamente pelo método de adição de padrão à amostra.

Por exemplo, a quantificação do ácido gálico foi efectuada através de uma recta de calibração [2.8] ($R = 0,999$) construída com soluções-padrão na gama de 0,05 a 2 mM (Anexo II B):

$$\text{Área}_{ag} = 1,165E7 c_{ag} + 66458,768 \quad [0.8]$$

onde Área_{ag} corresponde à área do pico cromatográfico do ácido gálico (mAU) e c_{ag} à concentração do mesmo composto expressa em mM.

Os resultados finais foram afectados do correspondente factor de concentração aplicado às amostras (Anexo II B).

2.3.6. ESPECTROMETRIA DE MASSA COM IONIZAÇÃO POR ELECTROSPRAY

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O processo de ionização por electrospray (*ElectroSpray Ionization* – ESI) pode ser resumido em três etapas: 1) formação de iões e nebulização; 2) dessolvatação; e 3) evaporação dos iões.

A amostra a ser analisada é inserida na câmara de nebulização onde, devido à combinação de um gás nebulizador pressurizado com um forte campo electrostático, se formam pequenas gotículas carregadas. Os iões formados são preferencialmente atraídos para a superfície das gotículas pelo campo electrostático. Sendo assim, a amostra é simultaneamente carregada e dispersa num spray de gotículas carregadas. Como a amostra não sofre nenhum aquecimento, não existe decomposição térmica dos analitos em estudo.

Antes de os iões poderem ser analisados é necessário remover o solvente. Frequentemente junta-se um gás de arraste (*e.g.* azoto) que pode ou não ser aquecido de modo a promover a evaporação do solvente, diminuindo o diâmetro das gotículas e forçando a aglomeração das partículas carregadas.

Quando a força de repulsão de Coulomb é igual à tensão superficial da gotícula, esta explode, produzindo gotículas menores favorecendo deste modo uma rápida evaporação e a formação de gotículas com uma densidade de carga superficial elevada. Este processo de ciclos de evaporação repete-se até se obterem gotículas que têm em média uma molécula de analito. Nessas condições o restante solvente evapora-se deixando a carga (ou cargas) existente na gota no ião formado. A energia de hidratação dos analitos no solvente determina a facilidade de desadsorção dos iões na fase gasosa. Em geral, quanto mais hidrofóbica é uma amostra num solvente (ainda que solúvel no mesmo), mais facilmente os iões são desadsorvidos na fase gasosa. Os iões dessolvatados são conduzidos para a região de pressão baixa através de um tubo capilar. Um sistema composto por guias e lentes electrostáticas transporta e foca os iões num feixe (enquanto os gases são removidos) que é conduzido para uma armadilha de iões (*ion trap*) que permite a detecção e análise mássica de forma selectiva. Os espectros obtidos apresentam uma relação m/z (massa/carga) para cada ião detectado ou fragmentos do mesmo.

A escolha dos solventes e de soluções tampão é a chave do sucesso da ionização por electrospray. Solventes como metanol ou acetonitrilo, que têm menor capacidade térmica, tensão superficial e constante dielétrica, promovem facilmente a nebulização e dessolvatação.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para a análise por electrospray foi utilizado um espectrómetro de massa Bruker Daltonics® HCT (ESI-QIT-MS). As amostras de efluente bruto e água de cozedura (250 µL) foram dissolvidas em 250 µL de acetonitrilo e esta solução foi introduzida no ESI através de uma bomba de

difusão com um fluxo constante de 250 $\mu\text{L/h}$. A temperatura do capilar foi ajustada para 250°C e o fluxo do gás de arraste (N_2) foi de 2 L/min. A análise de um ião específico é efectuada através do isolamento deste (ESI- MS^2), seguida de dissociação do ião por excitação selectiva do mesmo e quebra por colisão com um gás neutro.

2.3.7. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

A actividade antioxidante foi determinada segundo três metodologias distintas: 1) reacção de sequestração do radical DPPH \cdot ; 2) sequestração do radical anião superóxido seguida por fotoquimioluminescência e 3) capacidade antioxidante de redução férrica (FRAP), seguidamente descritas.

2.3.7.1. REACÇÃO DE SEQUESTRAÇÃO DO RADICAL DPPH \cdot

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Este método colorimétrico é baseado na medida da capacidade antiradicalar de um composto face ao radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH \cdot) (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995). Por acção de um composto antioxidante o radical DPPH \cdot é reduzido passando à sua forma estável DPPH-H (difenil-1-picril-hidrazina) (Figura 0.1). Esta reacção é monitorizada pela alteração de cor violeta (DPPH \cdot) para amarelo (DPPH-H), seguida por medida da absorvância a 515 nm, até ser atingido um patamar. A actividade do composto antioxidante (RH) medida neste teste está relacionada com a capacidade de doar um H, ou seja do número de grupos que contêm átomos de hidrogénio lábeis como é o caso dos grupos hidroxilo.

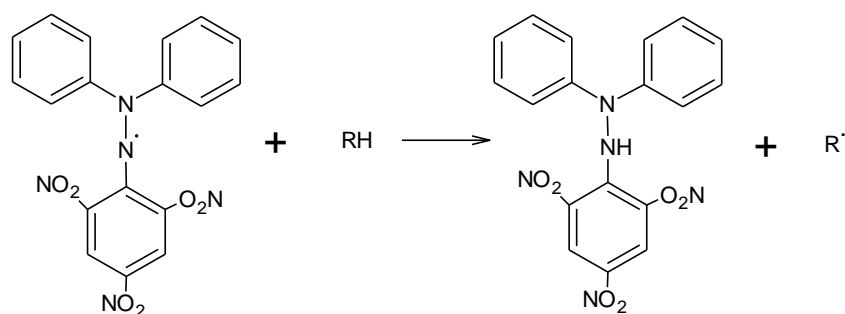


Figura 0.1 – Reacção de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH \cdot)

A quantificação da actividade antioxidante pode ser efectuada pela percentagem de inibição (sequestração) do radical DPPH[•] de uma solução de antioxidante com uma dada concentração, por comparação com um branco; pela quantidade de substância necessária para inibir 50% da absorvância devida ao radical DPPH[•] (EC₅₀); ou ainda recorrendo a uma recta de calibração com um padrão antioxidante.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Preparou-se uma solução padrão do radical DPPH[•] em metanol com a concentração de 60 µM. Os padrões de antioxidantes foram utilizados sob a forma de soluções aquosas nas seguintes gamas de concentração: ácido gálico (0,05-0,5 mM), ácido ferúlico (0,5-1,5 mM) e hidroquinona (0,5-2,0 mM) (Anexo II C).

Num ensaio típico, foram colocados num tubo de reacção 0,1 mL de amostra ao qual se adicionaram 3,9 mL da solução de DPPH[•] (60 µM). A mistura foi homogeneizada em vórtex e efectuaram-se leituras no espectrofotómetro (UV-1800, Shimadzu®) a 515 nm; a absorvância foi registada a cada minuto, durante 30 minutos ou até ser atingido um patamar, utilizando metanol como referência. Para o ensaio em branco substituiu-se a amostra por igual volume de água ultra pura sendo o restante procedimento igual ao descrito para as amostras. Todas as manipulações foram efectuadas ao abrigo da luz.

A actividade antioxidante da amostra foi quantificada pela determinação do EC₅₀ e/ou percentagem de inibição, e por comparação com o composto padrão utilizado (ácido gálico), sendo expressa percentagem de inibição e em unidades equivalentes deste composto, respectivamente (Anexo II C).

2.3.7.2. SEQUESTRAÇÃO DO RADICAL ANIÃO SUPERÓXIDO SEGUIDA POR FOTOQUIMIOLUMINESCÊNCIA

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O radical anião superóxido é um radical com relevância biológica mas com um tempo de vida muito reduzido. Este radical é produzido no meio reaccional na presença da amostra que contém

espécies antioxidantes; à medida que são formados os radicais são imediatamente neutralizados até esgotar todos os antioxidantes presentes na amostra. Como se utiliza um excesso dos reagentes produtores de radicais, uma vez esgotados os antioxidantes começam a acumular-se radicais superóxido no meio reaccional. A reacção dos radicais superóxido remanescentes com um composto fotossensibilizante (luminol) ocorre com emissão de luz que é detectada por um fotómetro (fotoquimioluminescência). Assim quanto maior for a inibição da emissão de luz por comparação com um branco maior será a concentração de compostos antioxidantes na amostra (Balogh, Hegedüs, & Stefanovits-Bányai, 2010).

O sinal de medição produzido pela luminescência é monitorizado por um período seleccionável (e.g. 1-3 minutos). Este teste pode ser efectuado em meio aquoso (ACW), adequado a amostras hidrofílicas, ou em meio metanólico (ACL), adequado a amostras hidrofóbicas.

Nas determinações ACW, existe um período de dormência (*lag time*) no qual não é observada a produção de luminescência. Quando se esgotam os antioxidantes presentes, a quantidade de radicais na amostra aumenta até o sinal detectado atingir o máximo. O valor do sinal (V) é lido em função do tempo (Figura 0.2) (AnalytikjenaAG, 2004).

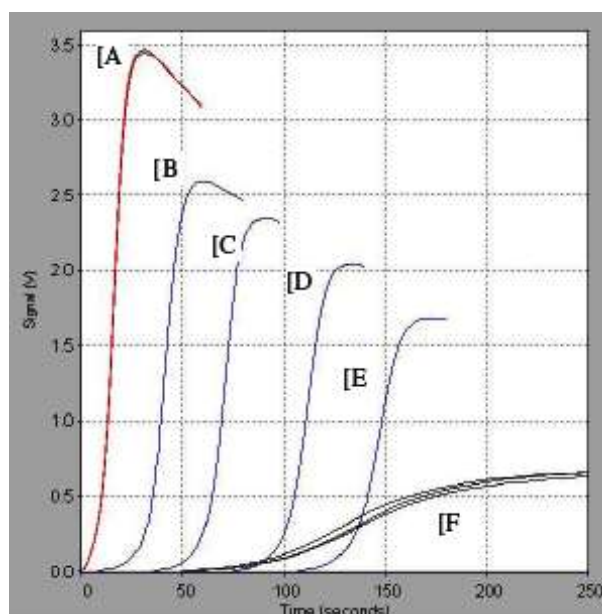


Figura 0.2 – Exemplo de curvas obtidas para ACW

Na Figura 0.2 apresenta-se um exemplo de 6 curvas típicas de leituras em Photochem[®], sendo [A] o branco, [B-E] soluções padrão e [F] uma amostra. A duração do período de dormência aumenta com a quantidade de antioxidantes na amostra, sendo determinada através da posição do zero da segunda derivada (ponto de inflexão). O ponto de intersecção da tangente a esse

ponto com o eixo das abcissas define o *lag-time*. Após a determinação do tempo de dormência, a actividade antioxidante da amostra é quantificada por comparação com o padrão utilizado (ácido ascórbico), através da construção de uma recta de calibração, sendo expressa em unidades equivalentes desse padrão (Anexo II D).

Relativamente ao ACL, a determinação da actividade antioxidante é baseada no cálculo da inibição por avaliação da área abaixo da curva de emissão de luminescência (Figura 0.3) (AnalytikjenaAG, 2004).

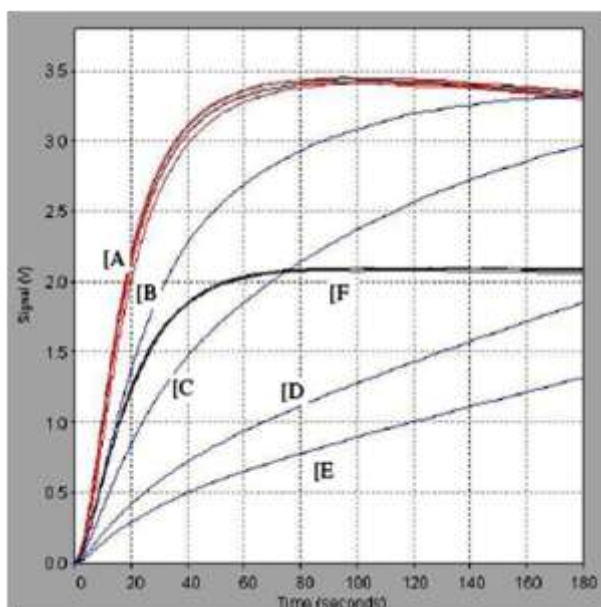


Figura 0.3 – Exemplo de curvas obtidas para ACL

Na Figura 0.3 apresenta-se um exemplo de 6 curvas típicas de leituras em fotoquimioluminescência, sendo [A] o branco, [B-E] soluções padrão e [F] uma amostra. A actividade antioxidante da amostra é quantificada por comparação com o padrão utilizado (através da construção de uma recta de calibração com padrões de trolox) e é expressa em unidades equivalentes deste composto (Anexo II E).

As vantagens do método de quimioluminescência fotossensibilizante são a velocidade de resposta e a sensibilidade na gama das nanomoles.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

ACW

Nos ensaios relativos à actividade antioxidante no extracto aquoso, pipetaram-se para um tubo de reacção 1500 μL do reagente 1 (solvente da amostra), 1000 μL do reagente 2 (tampão), 25 μL da solução de trabalho do reagente 3 (fotossensibilizante e reagente de detecção) e o volume da solução padrão de ácido ascórbico (reagente 4), correspondente a cada uma das concentrações definidas para a recta de calibração (Tabela 0.1); esta solução foi rapidamente homogeneizada e de imediato colocada no equipamento de análise (Photochem[®], Analytik Jena). A curva de calibração (Anexo II D) é construída automaticamente pelo equipamento após concluídas as leituras em duplicado de todas as soluções-padrão.

Tabela 0.1 – Soluções-padrão de ácido ascórbico

Solução de trabalho ácido ascórbico (μL)	Ácido ascórbico (nmol)
5	0,5
10	1,0
20	2,0
30	3,0

Na determinação da actividade antioxidante do extracto aquoso das amostras procedeu-se do mesmo modo acima descrito, substituindo-se apenas o volume de solução padrão de ácido ascórbico por 10 μL da amostra em estudo. Os ensaios foram efectuados em duplicado e foi aplicado um factor de diluição às amostras (Anexo II D).

Antes de cada série de análises no Photochem[®], é necessário efectuar ensaios em branco, até obter uma leitura estável; protocolo seguido é igual ao acima descrito substituindo-se o volume de solução padrão de ácido ascórbico por 10 μL de reagente 1.

ACL

Nos ensaios relativos à actividade antioxidante no extracto lipídico, pipetaram-se para o tubo de reacção 2300 μL do reagente 1 (metanol), 200 μL do reagente 2 (tampão), 25 μL da solução de trabalho do reagente 3 (fotossensibilizante e reagente de detecção) e o volume da solução padrão de trolox correspondente às várias concentrações da recta de calibração (Tabela 0.2)

(Anexo II E); o procedimento subsequente é idêntico ao descrito para as medidas da actividade antioxidante aquosa, diferindo apenas no padrão antioxidante utilizado (trolox).

Tabela 0.2 – Soluções padrão de trolox

Solução de trabalho Trolox (μL)	Trolox (nmol)
5	0,5
10	1,0
20	2,0
30	3,0
40	4,0

2.3.7.3. PODER ANTIOXIDANTE DE REDUÇÃO FÉRRICA (FRAP)

PRINCÍPIO DO MÉTODO

A determinação do poder antioxidante de redução férrica (Benzie & Strain, 1996) baseia-se na capacidade dos compostos antioxidantes para reduzirem o complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) à forma ferroso-tripiridiltriazina (Fe^{2+} -TPTZ) (Figura 0.4), em meio ácido (pH 3,6). O complexo reduzido apresenta uma cor azul intensa (azul da Prússia), cuja intensidade é medida espectrofotometricamente a 593 nm, e que está relacionada com a concentração de espécies antioxidantes redutoras presentes na solução.

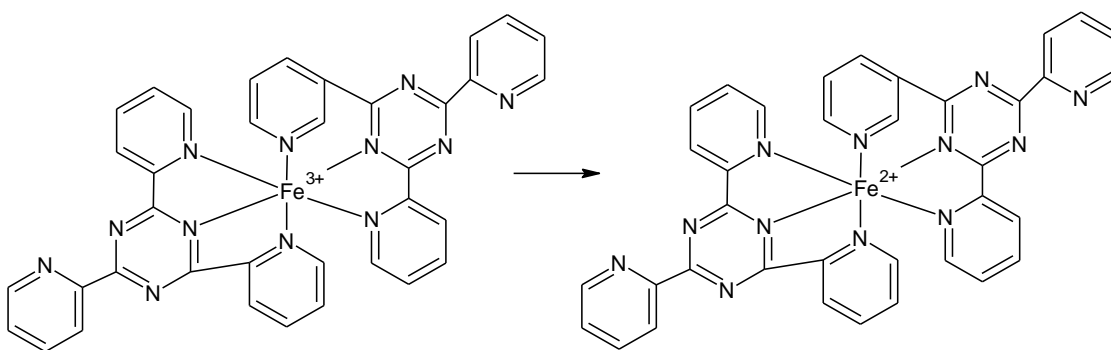


Figura 0.4 – Redução do complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ)

Algumas das limitações do método FRAP são a especificidade do mecanismo de reacção e a existência de compostos na amostra que interferem com a medição por absorverem no mesmo comprimento de onda.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Construiu-se uma recta de calibração utilizando soluções-padrão de sulfato ferroso na gama de concentrações de 0–1,0 mM. No tubo de reacção colocaram-se 100 µL da solução padrão de sulfato ferroso heptahidratado e adicionaram-se 3 mL da solução de FRAP (constituída por tampão acetato – 300 mM a pH 3,6; 2,4,6-tri[2-piridil]-s-triazina – 10 mM e cloreto férrico hexahidratado – 20 mM); incubou-se a mistura reaccional a 37 °C (em banho-maria) durante 10 minutos. Após este período efectuaram-se as leituras da absorvância a 593 nm em fotómetro (Pharmacia LKB – Novaspec® II); nos ensaios em branco substituí-se os 100 µL de solução-padrão de sulfato ferroso pelo mesmo volume de água ultra pura e nas determinações das amostras pelo mesmo volume da amostra. O poder redutor férrico da amostra é expresso em equivalentes de sulfato ferroso heptahidratado (mM). Todos os ensaios foram efectuados em triplicado e foi aplicado um factor de diluição às amostras (Anexo II F).

Capítulo 3 - Apresentação e Discussão de Resultados

3.1. AMOSTRAGEM

No presente capítulo são apresentados os resultados obtidos neste trabalho para 6 amostras de 2 tipos de efluentes de uma indústria de transformação de cortiça, recolhidas em 3 datas distintas durante o ano de 2010. Será também efectuada a discussão destes resultados enquadrando-os no estado da arte. As datas nas quais foram efectuadas as recolhas pontuais de efluentes na indústria Fabricor são apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Data das recolhas efectuadas

Recolhas	Data
1 ^a	07-05-2010
2 ^a	08-09-2010
3 ^a	14-10-2010

As recolhas foram efectuadas no tanque da água de cozedura e à entrada da Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) da Fabricor.

3.2. PARÂMETROS GERAIS AVALIADORES DO EFLUENTE

Na Tabela 3.2 são apresentados os resultados obtidos para as determinações da Carência Química de Oxigénio (CQO), Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO), Carbono Orgânico Total (COT) e pH para cada uma das recolhas efectuadas.

Tabela 3.2 – Parâmetros físico-químicos das amostras em estudo

Amostras	Recolhas	CQO (gO ₂ /L) (n = 3)	CBO (mgO ₂ /L) (n = 1)	COT (gCO ₂ /L) (n = 3)	pH (n = 1)	CBO/CQO
Água de cozedura	1 ^a	3,11 ± 0,07	182	3,34 ± 0,05	4,79	0,06
	2 ^a	3,48 ± 0,12	65	1,73 ± 0,01	4,77	0,02
	3 ^a	4,64 ± 0,46	20	1,71 ± 0,01	4,29	≈ 0
Efluente bruto	1 ^a	1,84 ± 0,12	250	3,59 ± 0,03	4,02	0,14
	2 ^a	3,54 ± 0,13	140	1,61 ± 0,01	4,79	0,04
	3 ^a	3,11 ± 0,36	180	1,02 ± 0,01	4,68	0,06

Sendo o efluente bruto uma mistura da água de cozedura e das águas de lavagem, seria expectável que contivesse menos matéria orgânica, pois as águas de lavagem são visivelmente mais diluídas do que as águas de cozedura. Pela observação da Tabela 3.2 podemos concluir que os valores de COT da água de cozedura são efectivamente superiores aos valores de COT do efluente bruto na 2^a e 3^a datas de recolha mas não na 1^a recolha. Esta observação pode significar

que as águas de lavagem apresentavam um elevado teor de matéria orgânica nesta data de amostragem. Observando a Tabela 3.2, verifica-se que os valores de CQO e COT não se relacionam entre si para ambas as amostras, ou seja, a quantidade de matéria orgânica oxidável não contribui da mesma forma para o valor obtido para o carbono orgânico total através de metodologia de combustão da amostra (ver 2.3.3). Relativamente ao CBO, em ambas as amostras os valores são muito baixos embora o efluente bruto apresenta valores superiores à água de cozedura para todas as recolhas efectuadas. Em trabalhos anteriormente realizados com a água de cozedura desta unidade industrial constatou-se que a carga microbiana presente é baixa (3×10^2 UFC/mL) (Melo, et al., 2010). Este facto poderá explicar os valores de CBO, uma vez que o número de microrganismos presentes não é suficiente para digerir a amostra, logo o consumo de oxigénio é baixo (baixo CBO). Relativamente ao pH das amostras verificamos que os valores são semelhantes para as amostras, sendo o menor valor registado para a 1ª recolha do efluente bruto.

3.3. COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (FOLIN-CIOCALTEU)

Para a determinação dos compostos fenólicos totais foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu. A recta de calibração (Anexo II A) foi realizada através das leituras das absorvâncias (765 nm) de soluções de ácido gálico a várias concentrações (0 – 3,0 mM), após reacção com o reagente de Folin-Ciocalteu. O coeficiente de correlação ($R = 0,997$) obtido indica que existe forte correlação linear entre os valores determinados experimentalmente. A determinação do teor de compostos fenólicos nas amostras (Anexo II A) foi efectuado por interpolação a partir da equação da recta ($y = 0,163 x + 0,025$), expressa em equivalentes de ácido gálico (mM). Na Tabela 3.3 são apresentados os valores obtidos para as duas amostras em estudo.

Tabela 3.3 – Compostos fenólicos totais nas amostras

Amostras	Recolhas	Fenólicos totais EAG* (mM) (n = 3)
Água de cozedura	1 ^a	4,519 ± 0,131
	2 ^a	3,793 ± 0,057
	3 ^a	5,440 ± 0,495
Efluente bruto	1 ^a	4,284 ± 0,054
	2 ^a	3,947 ± 0,027
	3 ^a	2,362 ± 0,064

* EAG – equivalentes de ácido gálico

Analisando a Tabela 3.3 constata-se que, em média, a água de cozedura tem conteúdo superior em compostos fenólicos totais em relação ao efluente bruto. Contudo a diferença não é significativa para a 1ª e 2ª recolha de ambas as amostras o que poderá indicar que não houve efeito de diluição no efluente bruto. Relativamente à 3ª recolha das duas águas estudadas, o valor máximo obtido para a água de cozedura ($\approx 5,4$ EAG mM) corresponde ao valor mínimo para o efluente bruto ($\approx 2,4$ EAG mM), o que pode indicar um efeito de diluição no efluente bruto devido às outras águas de processo e/ou alteração dos compostos fenólicos da água de cozedura.

Na Tabela 3.4 apresenta-se um resumo dos valores obtidos no nosso trabalho para os parâmetros avaliadores da qualidade das águas (ponto 3.2) e compostos fenólicos (ponto 3.3) e os que estão descritos na literatura.

Tabela 3.4 – Caracterização físico-química da água de cozedura

Parâmetros	Valores da literatura	Água de cozedura Fabricor
CQO¹ (mg/L)	2300 – 4600	3110 – 4640
CBO¹ (mg/L)	490 – 735	20 – 182
COT¹ (mg/L)	1220 – 2000	1710 – 3340
pH²	4,9	4,3 – 4,8
CBO/CQO¹	0,15 – 0,21	0 – 0,06
Compostos fenólicos totais² (EAG em mM)	5,63	3,79 – 5,44

¹ (Dias-Machado, Madeira, Nogales, Nunes, & Manaia, 2006); ² (Minhalma & Pinho, 2001a)

Observando a Tabela 3.4, conclui-se que os valores de CQO, COT, pH e compostos fenólicos totais estão de acordo com a literatura. Por outro lado os valores de CBO e de biodegradabilidade (CBO/CQO) são inferiores. Esta observação pode estar relacionada com uma diferença do binómio tempo/temperatura utilizado no processo da Fabricor relativamente aos exemplos mencionados na literatura, que influencia a quantidade de microrganismos presentes levando a valores mais baixos de consumo de oxigénio na digestão das amostras. Relativamente ao conteúdo em compostos fenólicos, a amostra estudada apresenta valor médio inferior ao descrito, o que poderá estar relacionado com o facto da água de cozedura na Fabricor ser filtrada entre cada ciclo de cozedura evitando a saturação por matéria orgânica, incluindo os compostos fenólicos

3.4. SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS EM ESTUDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) foram efectuadas curvas de calibração para todos os padrões em estudo (ácido gálico, ácido ferúlico e hidroquinona), de modo a determinar a sua concentração nas amostras em estudo. Para tal, e utilizando sempre as mesmas condições de análise, foram analisadas as três recolhas efectuadas de água de cozedura e de efluente bruto em HPLC.

COMPOSTOS PADRÃO

A gama de concentrações utilizada para construir as rectas de calibração para o ácido gálico, ácido ferúlico e hidroquinona foi 0,05 – 2,00 mM (Anexo II B). O tempo de retenção médio obtido para os compostos padrão testados foi de 8,2 minutos para o ácido gálico, 22,9 minutos para o ácido ferúlico e 6,5 minutos para a hidroquinona.

As rectas de calibração foram construídas através da relação entre a área dos picos (y) e as várias concentrações do padrão em análise (x). Os coeficientes de correlação obtidos (R) foram de 0,999 para os três compostos indicando que existe forte correlação linear entre as concentrações dos compostos padrão e a área dos picos obtidos nos cromatogramas a 280 nm.

AMOSTRAS

As amostras da água de cozedura e do efluente bruto recolhidas foram previamente filtradas com filtro de poro 0,45 μm , para garantir que as partículas em suspensão não entram no sistema de HPLC. Os cromatogramas obtidos são apresentados na Figura 3.1.

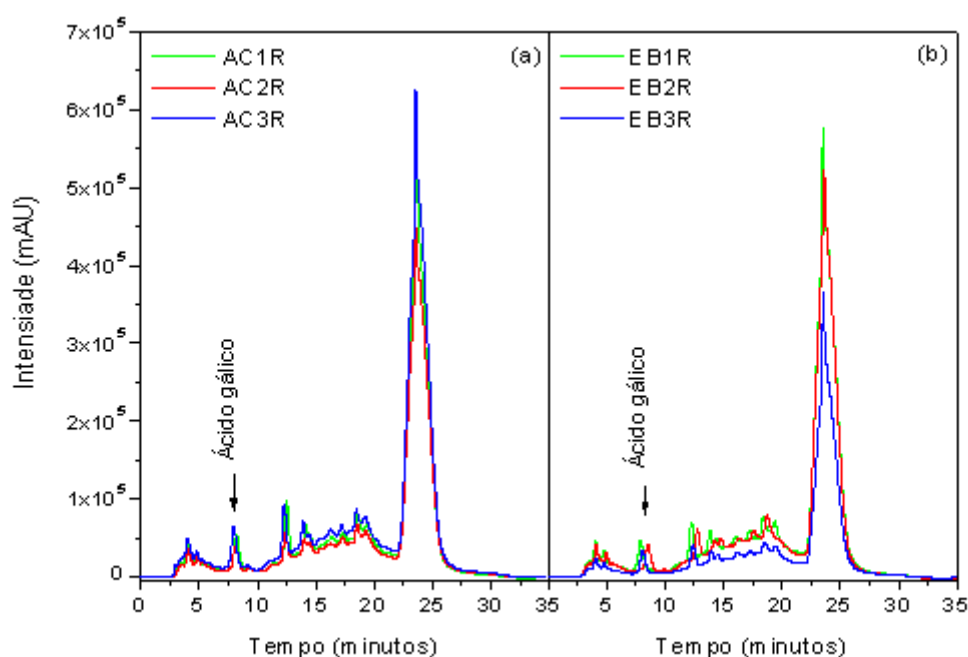


Figura 3.1 – Cromatogramas (a 280 nm) das recolhas de (a) água de cozedura (AC1R – 1ª recolha; AC2R – 2ª recolha e AC3R – 3ª recolha); e de (b) efluente bruto (EB1R – 1ª recolha; EB2R – 2ª recolha e EB3R – 3ª recolha)

Analisando os cromatogramas das três recolhas, para ambas as amostras, detectou-se o pico correspondente ao ácido gálico e, assim, determinou-se (ver Anexo II B) a concentração em que está presente nas amostras (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 – Concentração de ácido gálico em ambas as recolhas das águas residuais

Recolha	Ácido Gálico (mM)		
	Água de cozedura	Efluente bruto	
1ª	0,108	0,069	
2ª	0,074	0,055	
3ª	0,118	0,043	
Valores da literatura	0,610	-	Referências (Minhalma & Pinho, 2001a)
	0,206	-	(Minhalma & Pinho, 2001b)

Pela observação Tabela 3.5 podemos verificar que tanto a água de cozedura como o efluente bruto contêm uma baixa concentração de ácido gálico sendo, em média, 0,100 mM para a água de cozedura e 0,056 mM para o efluente bruto. Comparando os valores obtidos experimentalmente para a água de cozedura com a literatura verificamos que a concentração de ácido gálico é inferior ao descrito (Minhalma & Pinho, 2001a; Minhalma & Pinho, 2001b), o que poderá estar relacionado com a já mencionada filtração que a Fabricor efectua.

Para confirmar a existência dos antioxidantes em estudo, adicionou-se quantidades conhecidas dos diferentes padrões às amostras e analisou-se por HPLC. Na Figura 3.2 está representado o exemplo de um cromatograma obtido para a 2ª recolha de ambas as amostras.

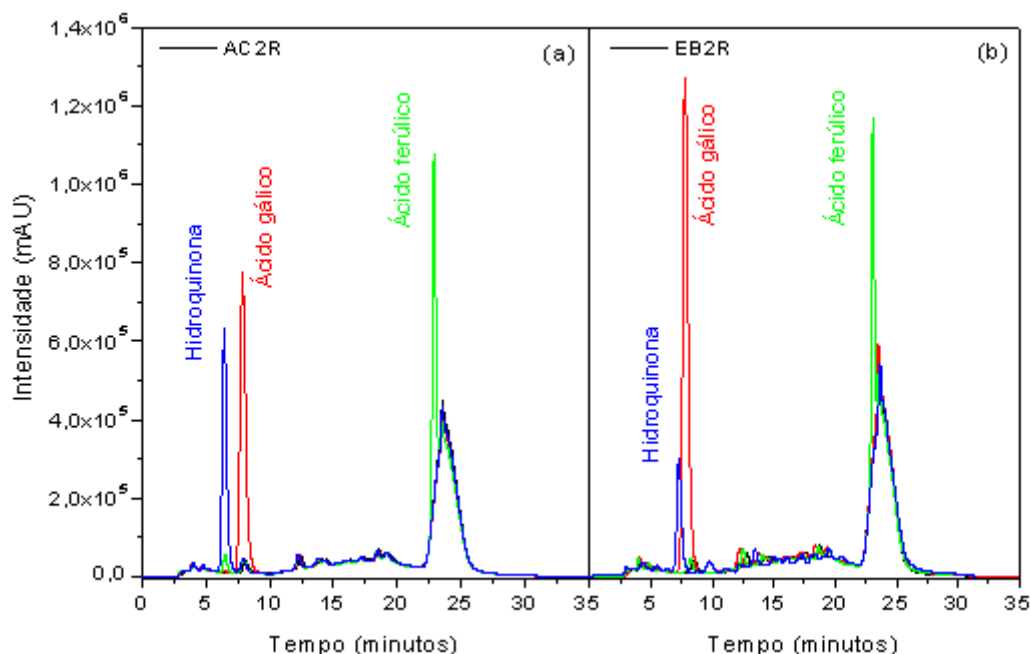


Figura 3.2 – Cromatogramas (a 280 nm) de água de cozedura (a) e do efluente bruto (b) da 2ª recolha com adição dos diferentes padrões

Analisando a Figura 3.2 verifica-se a presença de ácido gálico nas amostras em estudo. Aparentemente, a hidroquinona e o ácido ferúlico não estão presentes nas nossas amostras. Contudo existem picos não identificados nas amostras e para garantir que não correspondem ao ácido ferúlico e/ou à hidroquinona, analisaram-se as amostras através de espectrometria de massa por ionização por electrospray (ver ponto 3.5).

3.5. ESPECTROMETRIA DE MASSA POR IONIZAÇÃO POR ELECTROSPRAY

A técnica de espectrometria de massa por ionização por electrospray (ESI-MS) foi utilizada para confirmar quais os compostos presentes nas amostras em estudo. Apesar de estes efluentes aquosos serem complexos, a presença de iões típicos da fragmentação de um dado padrão tanto no modo negativo como no modo positivo, reforça a sua identificação como componente desta matriz. Assim analisaram-se inicialmente soluções de ácido gálico (Figura 3.3), ácido ferúlico

(Figura 3.4) e hidroquinona, a 0,1 mM, com uma concentração análoga à concentração de ácido gálico detectada nas amostras por HPLC. Analisaram-se com a mesma técnica as amostras de água de cozedura (Figura 3.5) e efluente bruto (Figura 3.6).

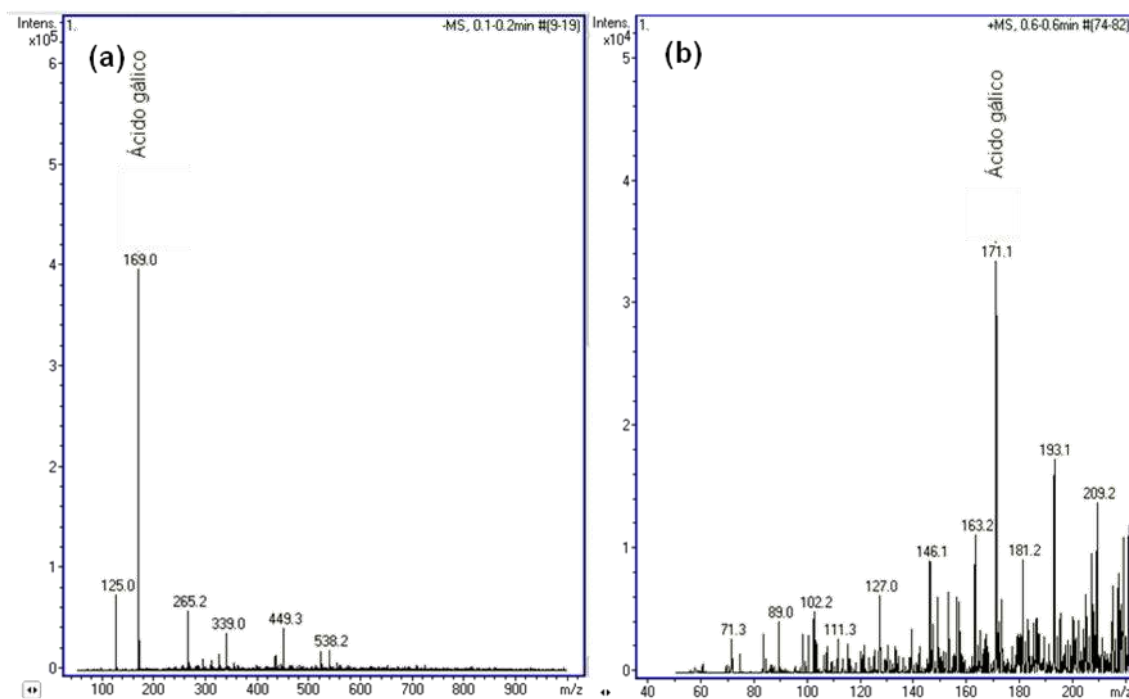


Figura 3.3 – Espectro de massa do ácido gálico; (a) modo negativo; (b) modo positivo

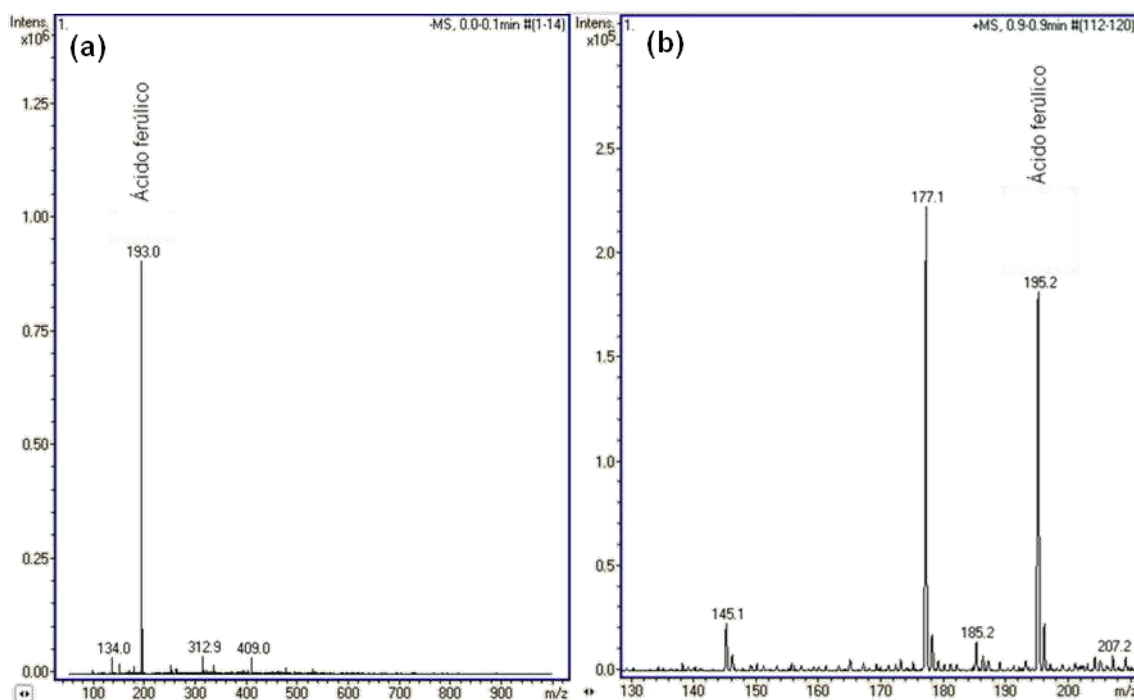


Figura 3.4 – Espectro de massa do ácido ferúlico; (a) modo negativo; (b) modo positivo

Na Figura 3.3 e Figura 3.4 estão representados os espectros obtidos para os padrões de ácido gálico e ácido ferúlico, respectivamente, em modo negativo e em modo positivo. Para confirmar a veracidade dos resultados, fez-se o isolamento e posterior fragmentação destes compostos e os resultados obtidos confirmam a presença de ácido gálico (fragmentos iónicos: 125, 97) e de ácido ferúlico (fragmentos iónicos: 177, 149, 134 e 117). Estes resultados encontram-se de acordo com o descrito na literatura (Fernandes, Sousa, Mateus, & Freitas, 2011) (Santos, Pinto, Silvestre, & Neto, 2010). Relativamente à hidroquinona, não se conseguiu observar o seu espectro de ionização. Este fenómeno poderá estar relacionado com o facto de não se ter ionizado o composto na câmara de nebulização.

AMOSTRAS

Seguidamente apresentam-se os espectros de massa obtidos através da ionização por electrospray para as primeiras recolhas efectuadas em cada água de processo em estudo (Figura 3.5 e Figura 3.6).

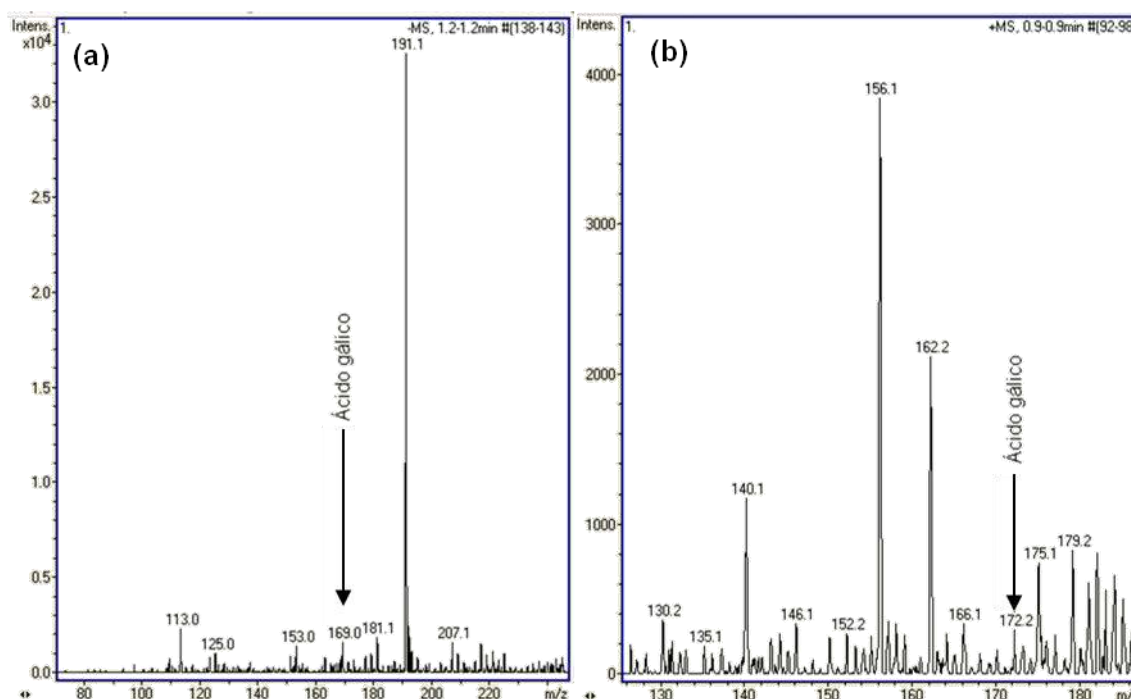


Figura 3.5 – Espectro de massa da água de cozedura, 1ª recolha; (a) modo negativo; (b) modo positivo

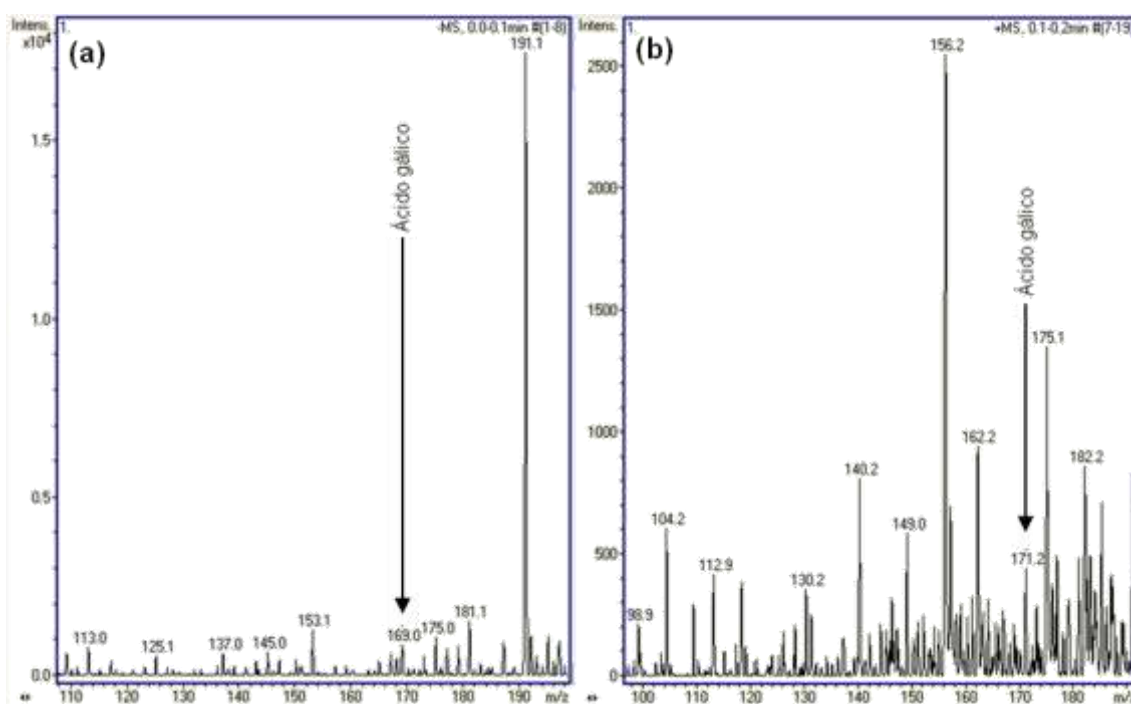


Figura 3.6 – Espectro de massa do efluente bruto, 1ª recolha; (a) modo negativo; (b) modo positivo

Pela observação da Figura 3.5 e Figura 3.6 podemos verificar que, dos compostos estudados, apenas o ácido gálico está presente nas três recolhas efectuadas para a água de cozedura. Contudo, analisando a tabela de dados do espectro de massa conseguiu-se identificar a presença de ácido ferúlico em muito baixa intensidade. Por outro lado, observou-se a presença de um pico predominante (m/z 191) em todas as amostras analisadas. Fez-se o isolamento e posterior fragmentação do composto (fragmentos iónicos: 173, 127, 111, 93 e 85) e verificou-se que se trata do ácido quínico, um composto presente em extractos de cortiça (Santos, Pinto, Silvestre, & Neto, 2010). Na Tabela 3.6 está representado o resumo dos compostos identificados através do ESI-MS.

Tabela 3.6 – Resumo dos compostos identificados pela técnica ESI-MS

Composto	<i>m/z</i>	Água cozedura			Efluente bruto		
		1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a
[M-H] ⁻							
Hidroquinona	109	-	-	-	-	-	-
Ácido gálico	169	+	+	+	+	+	+
Ácido quínico	191	+	+	+	+	+	+
Ácido ferúlico	193	+	+	+	+	+	+
[M+H] ⁺							
Hidroquinona	111	-	-	-	-	-	-
Ácido gálico	171	+	+	+	+	+	+
Ácido quínico	193	+	+	+	+	+	+
Ácido ferúlico	195	+	+	+	+	+	+

Dos compostos padrão em estudo só a hidroquinona não foi detectada nas diferentes recolhas de ambas as amostras.

3.6. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

A actividade antioxidante das amostras em estudo foi determinada por três métodos diferentes:

1) Reacção de sequestração do radical DPPH[•]; 2) Fotoquimioluminescência (sequestração do anião radical superóxido) e 3) Poder redutor férrico (FRAP), sendo que os resultados obtidos são apresentados nas pontas, 3.6.1, 3.6.2 e 3.6.3.

3.6.1. REACÇÃO DE SEQUESTRAÇÃO DO RADICAL DPPH[•]

Na Tabela 3.7 são apresentadas as percentagens de inibição do radical DPPH[•] e o valor de EC₅₀ para os compostos padrão em estudo. Os valores de EC₅₀ foram determinados com base nas rectas obtidas através da representação gráfica da percentagem de inibição do radical DPPH[•] em função das várias concentrações dos compostos padrão testadas (Anexo II C).

Tabela 3.7 – % Inibição do radical DPPH[•] e EC₅₀ para os compostos padrão

Composto padrão	Concentração (mM)	% Inibição DPPH	EC ₅₀ (mM)
Ácido gálico	0,05	10	0,29
	0,1	19	
	0,25	47	
	0,5	81	
Ácido ferúlico	0,5	10	2,40
	0,8	16	
	1,0	20	
	1,5	31	
Hidroquinona	0,5	30	1,43
	0,8	36	
	1,5	49	
	2,0	64	

Observando a Tabela 3.7, o ácido gálico é o antioxidante estudado que apresenta maior poder de inibição do radical DPPH[•] (81 % a 0,5 mM) e mesmo a concentrações baixas (0,05 mM) consegue inibir a formação do radical. A percentagem de inibição do radical DPPH[•] aumenta à medida que a concentração do composto padrão aumenta. Em relação aos valores de EC₅₀, constata-se que o ácido gálico é o composto padrão estudado que apresenta valor mais baixo de

concentração efectiva, seguindo-se da hidroquinona e, por último, do ácido ferúlico. Quanto mais baixos forem os valores de EC_{50} , maior é o seu poder antioxidante.

AMOSTRAS

Na Tabela 3.8 apresentam-se os valores da percentagem de inibição do radical DPPH[•] para as várias recolhas da água de cozedura e do efluente bruto e a actividade antioxidante expressa em equivalentes de ácido gálico (mM) (Anexo II C).

Tabela 3.8 – % Inibição do radical DPPH[•]

Amostra	Recolhas	Abs_{controlo} (515 nm)	Abs_{amostra} (515 nm)	% Inibição DPPH (n = 3)	EAG* (mM) (n = 3)
Água de cozedura	1 ^a	0,382	0,094	75	0,455 ± 0,001
	2 ^a	0,386	0,088	77	0,466 ± 0,001
	3 ^a	0,382	0,129	66	0,397 ± 0,003
Efluente bruto	1 ^a	0,382	0,102	73	0,443 ± 0,001
	2 ^a	0,426	0,110	74	0,447 ± 0,002
	3 ^a	0,382	0,111	71	0,428 ± 0,001

* EAG – equivalentes de ácido gálico

Os valores obtidos para a inibição do radical DPPH[•] são baixos e idênticos para ambas as amostras, o que poderá estar relacionado com a acessibilidade estérica do radical DPPH[•] com as estruturas dos antioxidantes presentes nestas águas (Prior, Wu, & Schaich, 2005). A variação da inibição do DPPH foi semelhante nas três datas de amostragem sendo ligeiramente superior na 2^a data de amostragem e ligeiramente inferior na 3^a data de amostragem.

3.6.2. FOTOQUIMIOLUMINESCÊNCIA (PHOTOCHEM[®])

A actividade antioxidante relativamente ao anião radical superóxido determinada pelo método de fotoquimioluminescência foi efectuada para o extracto aquoso (ACW - Antioxidant Capacity of Water soluble substances), de ambas as amostras, e para o extracto lipídico (ACL - Antioxidant Capacity of Lipid soluble substances) dos compostos padrão e das amostras. Desta forma pretende-se distinguir estes dois modos de medida da actividade de sequestração deste radical e avaliar se estas amostras contêm antioxidantes mais activos num dos modos de medida.

EXTRACTO AQUOSO (ACW)

A recta de calibração para o método ACW foi calculada através da determinação da inibição do radical anião superóxido para diferentes soluções de ácido ascórbico (0,05 – 0,3 $\mu\text{mol/mL}$) como padrão (Anexo II D). O coeficiente de determinação obtido foi 0,999, o que demonstra forte correlação linear entre a percentagem de inibição do radical anião superóxido e a concentração de ácido ascórbico ($\mu\text{mol/mL}$).

AMOSTRAS

Na Tabela 3.9 são apresentados os valores da actividade antioxidante obtidos para as amostras em estudo (Anexo II D).

Tabela 3.9 – Resultados do Photochem[®] para as amostras

Amostra	Recolhas	% Inibição radical anião superóxido (n = 2)	EAA* ($\mu\text{mol/mL}$) (n = 2)
Água de cozedura	1 ^a	78	16,2 \pm 1,1
	2 ^a	76	15,8 \pm 0,2
	3 ^a	80	16,7 \pm 0,6
Efluente bruto	1 ^a	50	9,9 \pm 2,6
	2 ^a	55	11,1 \pm 1,1
	3 ^a	66	13,6 \pm 0,6

* EAA – equivalentes de ácido ascórbico

Pela observação da Tabela 3.9 verificamos que os valores obtidos para a actividade antioxidante são similares entre as várias recolhas para a mesma amostra, sendo que a água de cozedura apresenta valores superiores ao efluente bruto. Por outro lado, alguma instabilidade nos resultados obtidos com padrões de antioxidantes (*e.g.* ácido gálico, ácido ferúlico e hidroquinona) nas medidas por ACW podem resultar de uma solubilidade limitada destes padrões. Assim considerou-se útil avaliar a actividade antioxidante no modo ACL, apesar de a matriz original ser aquosa.

EXTRACTO LIPÍDICO (ACL)

A recta de calibração para o extracto lipídico pelo método de fotoquimioluminescência foi calculada tendo sido utilizado o trolox como composto padrão, na gama de concentrações de 0,05 – 0,4 $\mu\text{mol/mL}$ (Anexo II E). O coeficiente de correlação obtido foi de 0,998 o que indica

que existe uma forte correlação linear entre a percentagem de inibição do radical anião superóxido e a quantidade de trolox ($\mu\text{mol/mL}$).

COMPOSTOS PADRÃO

Na Tabela 3.10 são apresentados os resultados obtidos para os compostos padrão no extracto lipídico (Anexo II E).

Tabela 3.10 – Resultados do Photochem[®] para os compostos padrão ($1,5 \times 10^{-7} \mu\text{mol/mL}$)

Compostos padrão	% Inibição radical anião superóxido (n = 2)	ET* ($\mu\text{mol/mL}$) (n = 2)
Ácido gálico	7	$1,1 \pm 0,4$
Ácido ferúlico	45	$12,8 \pm 0,6$
Hidroquinona	45	$12,9 \pm 0,2$

* ET – equivalentes de trolox

Pela observação da Tabela 3.10 verifica-se que o ácido gálico apresenta um menor poder antioxidante que o ácido ferúlico e a hidroquinona relativamente ao anião radical superóxido.

AMOSTRAS

Na Tabela 3.11 são apresentados os resultados obtidos pelo método Photochem[®] do extracto lipídico para as amostras em estudo (Anexo II E).

Tabela 3.11 – Resultados do Photochem[®] das amostras

Amostras	Recolhas	% Inibição radical anião superóxido (n = 2)	ET* ($\mu\text{mol/mL}$) (n = 2)
Água de cozedura	1 ^a	65	$18,9 \pm 1,4$
	2 ^a	55	$15,8 \pm 1,3$
	3 ^a	47	$13,4 \pm 0,03$
Efluente bruto	1 ^a	46	$13,3 \pm 1,0$
	2 ^a	30	$8,3 \pm 0,5$
	3 ^a	32	$8,8 \pm 1,0$

* ET – equivalentes de trolox

Pela observação da Tabela 3.11 verifica-se que a actividade antioxidante é superior nas amostras recolhidas no tanque de cozedura relativamente ao efluente bruto, sendo o maior valor registado

para a 1ª recolha da água de cozedura. Este resultado evidencia o efeito de diluição do efluente bruto relativamente à água de cozedura.

Alguns compostos padrão e antioxidantes presentes na amostra são igualmente solúveis nos solventes utilizados nos testes de ACW (água e tampões) e nos testes de ACL (metanol). Assim, existe alguma sobreposição entre os resultados destes dois modos de determinação da actividade antioxidante por fotoquimioluminescência.

3.6.3. PODER ANTIOXIDANTE DE REDUÇÃO FÉRRICA (FRAP)

A recta de calibração para o método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) foi calculada através da determinação da absorvância (a 593 nm) de várias soluções de sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) com concentrações de 0,1 – 1,4 mM (Anexo II F). O coeficiente de correlação obtido para a recta de calibração foi de 0,998, o que indica que existe forte correlação linear entre as concentrações de sulfato ferroso heptahidratado e as absorvâncias lidas.

COMPOSTOS PADRÃO

Na Tabela 3.12 apresentam-se os valores obtidos para o poder redutor férrico dos compostos padrão em estudo (Anexo II F).

Tabela 3.12 – Resultados obtidos para o FRAP para os compostos padrão (0,5 mM)

Composto padrão	Actividade antioxidante (mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (n = 3)
Ácido gálico	$2,560 \pm 0,057$
Ácido Ferúlico	$1,145 \pm 0,020$
Hidroquinona	$0,998 \pm 0,006$

* ESF – equivalentes de sulfato ferroso

Podemos verificar que o ácido gálico é o composto padrão que apresenta maior actividade antioxidante, seguido do ácido ferúlico e da hidroquinona (Tabela 3.12).

AMOSTRAS

Na Tabela 3.13 podem observar-se os valores obtidos para a actividade antioxidante das amostras em estudo pelo método de FRAP (Anexo II F).

Tabela 3.13 – Resultados obtidos do FRAP para as amostras

Amostra	Recolha	Actividade antioxidante (mM FeSO ₄ ·7H ₂ O) (n = 3)
Água de cozedura	1 ^a	8,783 ± 0,035
	2 ^a	5,301 ± 0,025
	3 ^a	6,755 ± 0,065
Efluente bruto	1 ^a	7,791 ± 0,123
	2 ^a	7,520 ± 0,065
	3 ^a	13,166 ± 0,074

Como podemos verificar pela observação da Tabela 3.13 o efluente bruto apresenta maior actividade antioxidante que a água de cozedura, ou seja um comportamento inverso do observado para o anião radical superóxido e distinto do radical DPPH[•]. Este facto poderá estar relacionado com o princípio de reacção que envolve o método FRAP (doação de electrões) que pode ter sido potenciado por compostos específicos presentes no efluente bruto.

3.7. CORRELAÇÕES

Na Tabela 3.15 e Tabela 3.16 encontram-se os coeficientes de correlação de Pearson (R) determinados para os vários métodos avaliados, para ambas as amostras. A classificação (Tabela 3.14) do coeficiente de correlação linear foi efectuada segundo Santos C. (2007).

Tabela 3.14 – Classificação da linearidade

Coeficiente de correlação	Correlação
$ R = 1$	Perfeita
$0,8 \leq R < 1$	Forte
$0,5 \leq R < 0,8$	Moderada
$0,1 \leq R < 0,5$	Fraca

Tabela 3.15 – Coeficientes de correlação entre os métodos avaliados (água de cozedura)

Métodos	FRAP	ACW	ACL	Folin-Ciocalteu	[AG]*
DPPH	-0,054	-0,952	0,735	-0,953	-0,778
FRAP	-	0,357	0,638	0,353	0,670
ACW	-	-	-0,492	1,000	0,933
ACL	-	-	-	-0,496	-0,145
Folin-Ciocalteu	-	-	-	-	0,931

* [AG] – concentração de ácido gálico determinada por HPLC

Analisando a Tabela 3.15 verifica-se que existe uma forte correlação positiva entre o teor de ácido gálico avaliado por HPLC e o teor de fenólicos totais (0,931), e a actividade sequestradora do anião superóxido pelo método ACW (0,933); também entre Folin-Ciocalteu e ACW existe uma correlação positiva forte (1,000); este resultado indica que o ácido gálico é um dos componentes das amostras de água de cozedura com uma forte contribuição para o resultado destes três testes.

Por outro lado os resultados obtidos pelo teste de DPPH apresentam uma correlação fortemente negativa os resultados de Folin-Ciocalteu (-0,953) o que poderá estar relacionado com o facto de não serem os compostos fenólicos totais a contribuírem para a actividade medida do radical DPPH[•]. A forte correlação negativa entre o método DPPH e os resultados do teste ACW (-0,952) poderão estar associados com diferenças de solubilidade dos compostos antioxidantes presentes. Relativamente ao teor de gálico medido por HPLC a correlação negativa com o DPPH é moderada (-0,778).

Observa-se uma correlação positiva moderada entre o teor de ácido gálico determinado em HPLC e a actividade redutora férrica (0,670), o que sugere que apesar de o teor de ácido gálico se correlacionar positivamente com o poder redutor, existem outros componentes das amostras de água de cozedura que contribuem para esta actividade. O mesmo acontece para as actividades antioxidantes avaliadas pelos testes ACL e DPPH (0,735) e pelos testes ACL e FRAP (0,638).

As restantes comparações conduziram a correlações fracas pelo que não permitem formular qualquer hipótese de interpretação.

Assim, no caso da água de cozedura parece verificar-se algum efeito de solubilidade nos resultados dos vários testes. O DPPH é insolúvel em água e solúvel em metanol, sendo também o metanol o solvente utilizado no teste ACL. Observaram-se correlações negativas (fortes ou moderadas) entre estes dois testes e as actividades medidas por testes efectuados em meio

aquoso como o ACW, o Folin-Ciocalteu e o teor de ácido gálico. Assim, os resultados apontam para que os compostos antioxidantes presentes apresentam maior solubilidade em soluções metanólicas quando comparadas com os ensaios em meio aquoso.

O teste FRAP parece ser afectado por outros factores que não a solubilidade dos antioxidantes no meio reaccional pois apresenta um comportamento distinto do DPPH. Uma causa possível para as diferenças observadas é o facto de este teste apresentar resultados positivos para espécies químicas que têm actividade redutora mas não têm actividade anti-radicalar.

Os coeficientes de Pearson obtidos para os vários métodos avaliados do efluente bruto são apresentados na Tabela 3.16.

Tabela 3.16 – Coeficientes de correlação entre os métodos avaliados (efluente bruto)

Métodos	FRAP	ACW	ACL	Folin-Ciocalteu	[AG]*
DPPH	-0,987	-0,866	0,230	0,934	0,719
FRAP	-	0,934	-0,380	-0,979	-0,819
ACW	-	-	-0,686	-0,987	-0,970
ACL	-	-	-	0,563	0,842
Folin-Ciocalteu	-	-	-	-	0,920

* [AG] – concentração de ácido gálico determinada por HPLC

No caso das amostras de efluente bruto verificamos que a actividade antioxidante avaliada pelo método de Folin-Ciocalteu apresenta uma correlação positiva forte com o método de DPPH (0,934) e uma moderada correlação positiva com o método ACL (0,563).

Também o teor de ácido gálico avaliado por HPLC apresenta uma forte correlação positiva com a actividade antioxidante avaliada pelo método ACL (0,842), com o teor de fenólicos determinado pela reacção de Folin-Ciocalteu (0,920) e uma moderada correlação positiva com a actividade antioxidante avaliada pelo método do DPPH (0,719).

Por outro lado a actividade redutora férrica (FRAP) apresenta uma correlação positiva forte com a actividade antioxidante avaliada pelo método ACW (0,934).

As actividades antioxidantes avaliadas pelos métodos de FRAP ou ACW apresentam correlações fortemente negativas com a actividade antioxidante avaliada pelo método do DPPH (-0,987; -0,866, respectivamente), com o teor de compostos fenólicos (-0,979; -0,987, respectivamente) e com o teor de ácido gálico determinado por HPLC (-0,819; -0,970, respectivamente).

A actividade antioxidante avaliada pelo método ACL tem uma correlação negativa moderada com o método ACW (-0,686) e uma correlação positiva moderada com o teor de compostos fenólicos (0,563).

Os resultados obtidos indicam que o efluente bruto pode conter antioxidantes diferentes dos existentes na água de cozedura, nomeadamente compostos extraídos nas operações de lavagem, ou componentes da água de cozedura que sofrem alterações.

Estes antioxidantes parecem ter uma boa capacidade redutora nas condições do método FRAP, uma vez que a actividade antioxidante medida por este método apresenta valores no efluente superiores aos apresentados na água de cozedura. Por outro lado, estes antioxidantes não são compostos fenólicos uma vez que não foram detectados em HPLC e não contribuíram para um maior teor de compostos fenólicos no efluente.

O radical DPPH[•] é relativamente estável e, portanto, menos reactivo do que outros radicais livres. Assim, o radical DPPH[•] pode ser neutralizado principalmente por compostos fortemente redutores, tais como os compostos fenólicos (Stratil, Klejdus, & Kuban, 2007). Os resultados obtidos suportam esta afirmação através da forte correlação entre o método de DPPH e o método de determinação dos fenólicos totais (Folin-Ciocalteu), para ambas as amostras.

Capítulo 4 - Conclusões e Trabalho Futuro

4.1. CONCLUSÕES

O trabalho desenvolvido neste estudo pretendeu identificar e quantificar três potenciais antioxidantes (ácido gálico, hidroquinona e ácido ferúlico) em águas de processo da indústria corticeira Fabricor, avaliar a capacidade antioxidante destes efluentes recorrendo a três metodologias diferentes (DPPH, FRAP, fotoquimioluminescência) e determinar o teor de compostos fenólicos totais pela reacção de Folin-Ciocalteu. Os parâmetros gerais avaliadores das águas residuais também foram determinados para as mesmas amostras.

Os resultados obtidos relativamente aos parâmetros avaliadores evidenciam que o efluente bruto apresentou maior biodegradabilidade (CBO/CQO) que a água de cozedura, ou seja o efluente bruto é potencialmente mais biodegradável que a água de cozedura. Esta constatação pode estar relacionada com a concentração média dos compostos fenólicos presentes nas amostras (água de cozedura – 4,584 EAG mM; efluente bruto – 3,531 EAG mM), uma vez que quanto menor for o conteúdo em fenólicos, maior poderá ser biodegradabilidade já que os compostos fenólicos, mesmo em baixas concentrações, são tóxicos para diversos microrganismos. Relativamente aos valores de CBO, verifica-se que para ambas as amostras os resultados determinados experimentalmente são baixos, indicando que a matéria orgânica presente nas águas em estudo não é degradada pela acção dos microrganismos e/ou que a flora microbiana que sobreviveu ao binómio tempo/temperatura a que foram sujeitas, não é suficiente para degradar a matéria orgânica existente. Em relação aos parâmetros avaliadores das águas residuais pode-se ainda concluir que a água de cozedura apresenta valores superiores de CQO e COT, como seria de esperar, tendo em conta que esta água residual obtém-se após uma extracção a quente de compostos da cortiça enquanto as águas de lavagem correspondem a extracções a frio deste mesmo material. Analisando o pH das amostras verifica-se que os valores obtidos são muito semelhantes entre recolhas e com os descritos na literatura (Minhalma & Pinho, 2001a).

Na avaliação do conteúdo fenólico presente nas águas de processo da Fabricor, constatou-se que os valores obtidos são comparáveis entre si e com os descritos na literatura (Minhalma & Pinho, 2001a). Pelo método de Folin-Ciocalteu podemos inferir que as amostras em estudo apresentam uma elevada concentração de fenólicos totais (água de cozedura – 4,584 EAG mM; efluente bruto – 3,531 EAG mM).

Os compostos antioxidantes estudados foram o ácido gálico, ácido ferúlico e hidroquinona. Encontra-se descrito na literatura que os ácidos gálico e ferúlico fazem parte da composição da água da cozedura da cortiça (Minhalma & Pinho, 2001a) (Minhalma & Pinho, 2001b). Contudo,

através da análise cromatográfica por HPLC, apenas o ácido gálico foi identificado e quantificado em ambas as amostras estudadas. Recorrendo à técnica ESI-MS foi possível confirmar a presença de ácido gálico e detectar o ácido ferúlico nas amostras analisadas. Analisando os seis espectros de massa obtidos para as duas amostras, observou-se a presença de picos típicos do ácido quínico (m/z 191), um antioxidante encontrado na cortiça pela primeira vez por Santos, et al. (2010). O facto do ácido quínico não ter sido detectado em HPLC poderá estar relacionado com a baixa concentração do composto nas amostras face à sensibilidade da técnica analítica.

Na determinação da actividade antioxidante da água de cozedura e do efluente bruto foram utilizadas três técnicas distintas: 1) reacção de sequestração do radical DPPH[•]; 2) fotoquimioluminescência (Photochem[®]) e 3) Poder redutor férrico (FRAP).

Na análise do radical DPPH[•] para os compostos padrão estudados (concentração de 0,5 mM), a percentagem de inibição deste radical foi de 81, 10 e 30 % para o ácido gálico, ácido ferúlico e hidroquinona, respectivamente. Verificou-se também que o ácido gálico, mesmo a concentrações baixas (0,05 mM), apresenta capacidade de inibir a formação do radical (10 %). Foi ainda determinado o valor de EC₅₀ (quanto menor, mais elevada a capacidade antioxidante) para cada um dos compostos antioxidantes estudados, tendo-se obtido os seguintes valores 0,29; 2,40 e 1,43 mM para o ácido gálico, ácido ferúlico e hidroquinona, respectivamente. Estes valores expressam a mesma tendência que a percentagem de inibição do radical DPPH[•]. Os resultados obtidos na técnica do radical DPPH[•] foram idênticos para as duas amostras, sendo que estes efluentes apresentam uma capacidade anti-radicalar moderada (\approx 73 %).

Utilizando a técnica de determinação da actividade antioxidante por fotoquimioluminescência, não foi possível determinar a actividade antioxidante dos compostos padrão em estudo em meio aquoso, como já foi referido no ponto 3.6.2. Utilizando a mesma técnica em modo lipídico avaliou-se a actividade antioxidante destes padrões, sendo que os valores obtidos apontam para uma actividade antioxidante moderada do ácido ferúlico e da hidroquinona (45 %) enquanto o ácido gálico apresenta um valor muito baixo de percentagem de inibição do radical anião superóxido (7 %). Este resultado pode dever-se ao facto do ácido gálico não ser tão solúvel em metanol como é em meio aquoso.

Os resultados obtidos para a actividade antioxidante medida em meio aquoso (ACW) e em meio lipídico (ACL) são idênticos entre amostras, sendo que a água de cozedura apresenta, em ambos os modos, valores superiores (ACW \approx 78 %; ACL \approx 56 %) ao efluente bruto (ACW \approx 57 %;

ACL \approx 36 %). Esta diferença poderá ser explicada pelo efeito de diluição, uma vez que o efluente bruto é composto por água de cozedura e água de lavagem das rolhas de cortiça. A análise dos valores determinados por estes dois métodos distintos de fotoquimioluminescência permite-nos concluir que a água de cozedura apresenta uma elevada actividade antioxidante, em meio aquoso, e que os antioxidantes presentes nas águas de processo são mais solúveis em água do que em metanol (solvente do método lipídico), o que está de acordo com a matriz das amostras.

A actividade antioxidante dos compostos padrão avaliada pelo método de FRAP permitiu concluir que o ácido gálico é o composto que apresenta maior actividade redutora, seguido do ácido ferúlico e da hidroquinona (2,560, 1,145 e 0,998 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mM). No método de FRAP o efluente bruto apresenta um valor médio superior de actividade antioxidante (\approx 9,5 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mM) quando comparado com a água de cozedura (\approx 6,9 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mM). Esta diferença poderá estar relacionada com o facto de os antioxidantes presentes no efluente bruto utilizarem preferencialmente o mecanismo de oxidação de transferência de electrões (mecanismo de oxidação do FRAP), enquanto na água de cozedura o mecanismo poderá ser tendencialmente por transferência de átomos de hidrogénio, onde o método não tem sensibilidade de detecção.

As correlações efectuadas entre as diferentes metodologias aplicadas esclarecem que no caso da água de cozedura parece verificar-se algum efeito de solubilidade nos resultados dos vários testes. Os resultados apontam para que os compostos antioxidantes presentes apresentem maior solubilidade em soluções metanólicas quando comparadas com os ensaios em meio aquoso. O teste FRAP parece ser afectado por outros factores que não a solubilidade dos antioxidantes no meio reaccional pois apresenta um comportamento distinto do DPPH. Uma causa possível para as diferenças observadas é o facto de este teste apresentar resultados positivos para espécies químicas que têm actividade redutora mas não têm actividade anti-radicalar.

As correlações efectuadas com os dados relativos ao efluente bruto indicam que este pode conter antioxidantes diferentes dos existentes na água de cozedura, nomeadamente compostos extraídos nas operações de lavagem, ou componentes da água de cozedura que sofreram alterações. Estes antioxidantes parecem ter uma boa capacidade redutora nas condições do método FRAP, uma vez que a actividade antioxidante medida por este método apresenta valores no efluente superiores aos apresentados na água de cozedura. Por outro lado, estes antioxidantes não são compostos fenólicos uma vez que não foram detectados em HPLC e não contribuíram para um maior teor de compostos fenólicos no efluente.

Pela análise global dos resultados obtidos podemos verificar que a actividade antioxidante é superior na água de cozedura, quando avaliada pelo método de fotoquimioluminescência (extractos aquoso e lipídico), idêntica para ambas as amostras pelo método de DPPH e inferior para a água de cozedura na metodologia de FRAP. Relativamente ao conteúdo fenólico e concentração de ácido gálico nas amostras, a água de cozedura apresenta valores superiores relativamente ao efluente bruto, o que poderá estar interligado com efeito de diluição já nomeado e/ou com a presença de outros compostos na água de cozedura que contribuem para a actividade redutora férrica.

Relativamente aos compostos padrão em estudo, a aplicação de diferentes metodologias de avaliação da actividade antioxidante em diferentes concentrações de compostos padrão permite-nos compreender melhor como o mecanismo de reacção (*e.g.* transferência de electrão, doação de H) de cada um dos métodos pode influenciar os resultados finais, conduzindo a uma melhor compreensão da complexidade de amostras como a água de cozedura da cortiça.

Como conclusão final, a água de processo que apresenta maior actividade antioxidante média bem como concentração de compostos fenólicos e de ácido gálico é a água de cozedura. Assim, este efluente terá um maior potencial de estudo, com vista ao reaproveitamento deste produto subsidiário e a uma maior rentabilidade económica do sector.

4.2. TRABALHO FUTURO

Relativamente ao trabalho futuro que poderá ser desenvolvido para dar continuidade ao estudo aqui apresentado, podemos apontar algumas sugestões, tais como:

1. Aplicar outras técnicas cromatográficas que permitam identificar e quantificar compostos com possível capacidade antioxidante presentes nas amostras;
2. Estudar o perfil antioxidante e potencial de aplicação dos compostos desconhecidos;
3. Avaliação de métodos de extracção dos compostos antioxidantes estudados das águas de processo da Fabricor;
4. Purificar as fracções antioxidantes extraídas;
5. Melhorar os parâmetros físico-químicos das águas de processo, de modo a reutilizá-la dentro da própria indústria; e reutilizar os compostos purificados nas diversas indústrias (*e.g.* indústria alimentar, curtumes, cosmética e farmacêutica).

Capítulo 5 - Referências Bibliográficas

5.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acero, J. L., Benitez, F. J., Leal, I., & Real, F. J. (2005). Removal of Phenolic Compounds in Water by Ultrafiltration Membrane Treatments. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* , 40 (8), 1585 —1603.

Adegoke, G., Vijay Kumar, M., Gopala Krishna, A. G., Varadaraj, M. C., Sambaiah, K., & Lokesh, B. R. (1998). Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. *J Food Sci Technol* , 35 (4), 283-398.

AnalytikjenaAG. (2004). Determination of water – (ACW) and lipid – (ACL) soluble antioxidative capacity in cream. 1-8.

Angelo, P., & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* , 66 (1), 232-240.

APCOR. (2009). *APCOR anuário*. Associação Portuguesa de Cortiça.

APCOR. (s.d.). <http://www.apcor.pt/>. Obtido em 18 de Março de 2011, de <http://www.apcor.pt>

Balogh, E., Hegedüs, A., & Stefanovits-Bányai, E. (2010). Application of and correlation among antioxidant and antiradical assays for characterizing antioxidant capacity of berries. *Scientia Horticulturae* , 125, 332–336.

Benavente-Garcia, O. (1999). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry* , 68, 457-462.

Benitez, F. J., Acero, J. L., Garcia, J., & Leal, A. I. (2003). Purification of cork processing wastewaters by ozone, by activated sludge, and by their two sequential applications. *Water Research* , 37, 4081–4090.

Benitez, F., Real, F., Acero, J., Leal, A., & Garcia, C. (2005). Gallic acid degradation in aqueous solutions by UV/H₂O₂ treatment, Fenton's reagent and the photo-Fenton system. *Journal of Hazardous Materials* , 126, 31-39.

Benítez, J. F., Acero, J. L., & Leal, A. I. (2008). Treatment of wastewaters from the cork process industry by using ultrafiltration membranes. *Desalination* , 229 (1-3), 156-169.

Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power - the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* , 239, 70-76.

Bernardo, M., Santos, A., Cantinho, P., & Minhalma, M. (2011). Cork industry wastewater partition by ultra/nanofiltration: A biodegradation and valorisation study. *Water Research* , 45, 904-912.

Boletim mensal de Actividade Económica. (2007). Instituto Nacional de Estatística.

Boots, A., Haenen, G., & Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology* , 585, 325-337.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* , 25-30.

Broinizi, P., Andrade-Wartha, E., Silva, A., Novoa, A., Torres, R., Azedero, H., et al. (2007). Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* , 27 (4), 902-908.

Ciesla, W. M. (2002). *Non-wood forest products from temperate broad-leaved trees* (Vol. 15). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Cortiça - suplemento ao Boletim Cortiça N.º 600. (1988). Portugal: Instituto dos Produtos Florestais.

Cortiça, A. P. (2009). *APCOR anuário*. Associação Portuguesa de Cortiça.

Decreto-Lei n.º 236/98. (1998). DIÁRIO DA REPÚBLICA — I SÉRIE-A, N.º 176 — 1-8-1998.

Dias-Machado, M., Madeira, L. M., Nogales, B., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2006). Treatment of cork boiling wastewater using chemical oxidation and biodegradation. *Chemosphere* , 64, 455-461.

Fernandes, A., Sousa, A., Mateus, N., & Freitas, V. (2011). Analysis of phenolic compounds in cork *Quercus suber* L. by HPLC-DAD/ESI-MS. *Food Chemistry*, 125, 1398–1405.

Ferrari, C. K. (1998). Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. *Rev. Nutr.*, 11 (1), 3-14.

Geraldes, V., Minhalma, M., Pinho, M. N., Anil, A., Ozgunay, H., Bitlisli, B., et al. (2009). Nanofiltration of cork wastewaters and their possible use in leather industry as tanning agents. *Polish J. of Environ. Stud.*, Vol. 18, No. 3, 353-357.

Guedes, A. M., Madeira, L. M., Boaventura, R. A., & Costa, C. A. (2003). Fenton oxidation of cork cooking wastewater— overall kinetic analysis. *Water Research*, 37, 3061–3069.

<http://www.fabricor.pt/>. (s.d.). Obtido em 25 de Fevereiro de 2011, de <http://www.fabricor.pt/>

Lidon, F., & Silvestre, M. M. (2010). *Princípios de Alimentação e Nutrição Humana*. Lisboa: Escolar Editora.

MacDonald-Wicks, L., Wood, L., & Garg, M. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2046–2056.

Machado, M. M. (2005). *Degradação Biológica de Polifenóis - Isolamento e Caracterização de Bactérias Mesofílicas e Termofílicas de Água de Cozedura de Cortiça*. Porto: Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa.

Magalhães, L., Segundo, M., Reis, S., & Lima, J. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613, 1-19.

Martinez-Valverde, I., Periago, M. J., & Provan, G. (2002). Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *J Sci Food Agric*, 82(3), 323-330.

Melo, R., Verde, C., S., Nunes, I., Oliveira, S., Leal, J., et al. (2010). Natural cork wastewater isolated bacteria as potential precursors of phenolic compound biodegradation. *The Water Research Conference*. Lisboa.

- Mendonça, E., Pereira, P., Martins, A., & Anselmo, A. M. (2004). Fungal Biodegradation and detoxification of cork boiling wastewaters. *Eng. Life Sci.* , 4 (2), 144-149.
- Minhalma, M., & Pinho, M. N. (2001a). Flocculation/Flotation/Ultrafiltration Integrated Process for the Treatment of Cork Processing Wastewaters. *Environ. Sci. Technol.* , 35, 4916-4921.
- Minhalma, M., & Pinho, M. N. (2001b). Tannic-membrane interactions on ultrafiltration of cork processing wastewaters. *Separation and Purification Technology* , 22–23, 479–488.
- Ministério da Agricultura, d. D. (2000). *O sobreiro e a cortiça - Um património universal, uma herança a preservar*. Lisboa, Portugal: Direcção-Geral de Desenvolvimento Rural.
- Moreira, A. V., & Mancini-Filho, J. (2004). Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. *Rev Nutr* , 17 (4), 411-424.
- Nakatani, N. (1996). Antioxidants from spices and herbs. *Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications* , 4, 64-75.
- Natividade, V. (1934). *Cortiças - Contribuição para o estudo do melhoramento da qualidade*. Direcção Geral dos Serviços Florestais e aquícolas.
- Peres, J. A., Heredia, J. B., & Domínguez, J. R. (2004). Integrated Fenton's reagent—coagulation/flocculation process for the treatment of cork processing wastewaters. *Journal of Hazardous Materials* , B107, 115-121.
- Pinto, P., Sousa, A., Silvestre, A., Neto, C., Gandini, A., Eckerman, C., et al. (2009). Quercus suber and Betula pendula outer barks as renewable sources of oleochemicals: A comparative study. *Ind. Crops Prod.* , 29, 126–132.
- Pintor, A., Vilar, V., & Boaventura, R. (2011). Decontamination of cork wastewaters by solar-photo-Fenton process using bleaching wastewaters as H₂O₂ source. *Solar Energy* , 85, 579–587.
- Prado, A. (2009). *Composição fenólica e actividade antioxidante de frutas tropicais*. Piracicaba: Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz".

- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* , 53, 4290-4302.
- Santos, A., Pinto, P., Silvestre, A., & Neto, C. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of phenolic extrat«cts of cork from *Quercus suber* L. *Industrial Crops and Products* , 31, 521-526.
- Shahidi, F., & Naczk, M. (2005). Analysis of Polyphenols in Foods. In S. Ötles (Ed.), *Methods of Analysis of Food Components and Additives* (pp. 199-259). Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Shahidi, F., Janitha, P., & Wanasundara, P. (1992). Phenolics antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* , 32 (1), 67-103.
- Shami, N. J., & Moreira, E. A. (2004). Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição* , 17 (2), 227-236.
- Silva, C. A., Madeira, L. M., Boaventura, R. A., & Costa, C. A. (2004). Photo-oxidation of cork manufacturing wastewater. *Chemosphere* , 55, 19-26.
- Silva, M. (2010). A cotiça - suas características e propriedades. *Apontamentos de tecnologia dos produtos florestais* . Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Silva, S., Sabino, M., Fernandes, E. M., Correlo, V., & Boesel, L. (2005). Cork: properties, capabilities and applications. *International Materials Reviews* , 50 (6), 345-365.
- Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr* , 15 (1), 71-81.
- Stalikas, C. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* , 30, 3268–3295.
- Stratil, P., Klejdus, B., & Kuban, V. (2007). Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Elsevier - Talanta* , 71, 1741-1751.
- Szymonik-Lesiuk, S., Czechowska, G., Stryjecka-Zimmer, M., Słomka, M., Madro, A., Celiński, K., et al. (2003). Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities

in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* , 10, 309–315.

Teixeira, A., Santos, J., & Crespo, J. (2009). Sustainable membrane-based process for valorisation of cork boiling wastewaters. *Separation and Purification Technology* , 66, 35-44.

Waterhouse, A. (2002). Determination of Total Phenolics. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (pp. 1-8). John Wiley & Sons, Inc.

Wettasinghe, M., & Shahidi, F. (1999). Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. *J Agric Food Chem* , 47, 1801-1812.

Anexos

ANEXO I

A. Correção de erros sistemáticos na determinação da CQO

Tabela 0.1 – CQO teórica e experimental para soluções-padrão com diferentes concentrações de KHP

CQO _{teórico} (mgO ₂ /L)	50	100	200	350	500	650	850	1000
KHP (g)	0,043	0,085	0,170	0,291	0,425	0,553	0,723	0,853
[KHP] (mmol/L)	0,208	0,416	0,833	1,423	2,082	2,706	3,539	4,164
CQO _{experimental} (mgO ₂ /L)	33,53	78,67	188,29	310,81	459,12	607,44	800,89	944,04

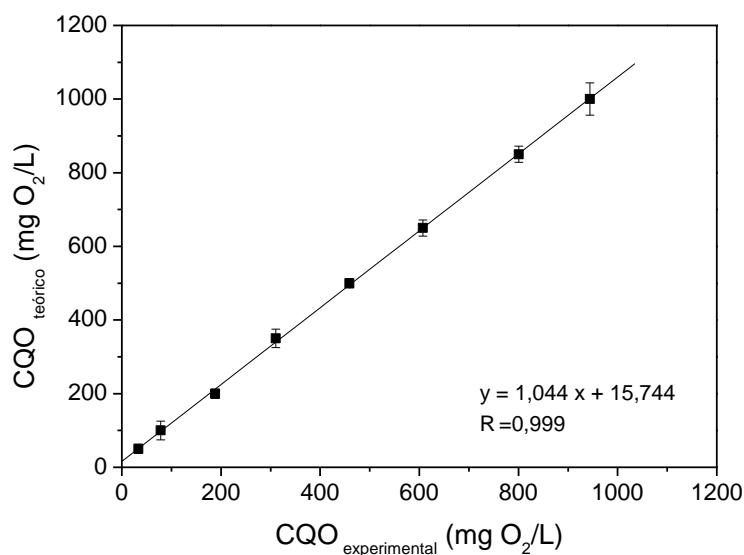


Figura 0.1 – CQO_{experimental} em função CQO_{teórico}

Na Figura 0.1 observa-se uma relação linear entre as duas variáveis representadas, com um valor de coeficiente de correlação (R) de 0,999. A equação obtida experimentalmente e que descreve a relação linear entre estas variáveis é:

$$CQO_{teo} = 1,044 CQO_{exp} + 15,744$$

em que CQO_{exp} é o valor teórico ou corrigido e CQO_{teo} o valor experimental, ou seja, o valor da CQO medido com o protocolo estabelecido. Os ensaios foram realizados em triplicado e com as amostras diluídas.

Exemplo de cálculo da CQO para a 1ª recolha da água de cozedura (1ª réplica):

$A - 2,77 \text{ mL};$

$B - 2,05 \text{ mL};$

$C - 0,12 \text{ mol/L};$

$Volume_{amostra} - 2,5 \text{ mL};$

$$CQO = \frac{(A - B) \times C \times 8000}{Volume_{amostra}} \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow CQO = \frac{(2,77 - 2,05) \times 8000 \times 0,12}{2,5} \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow CQO = 276,5 \text{ mgO}_2/\text{L}$$

O valor obtido para a CQO corrigido:

$$CQO_{teo} = (1,044 \times 276,5) + 15,744 \Leftrightarrow CQO_{teo} = 304,4 \text{ mgO}_2/\text{L}$$

Aplicando o factor de diluição ($FD = 10$) obtém-se $3044 \text{ mgO}_2/\text{L}$. Para as restantes réplicas de ambas as amostras procedeu-se da mesma forma e fez-se o respectivo tratamento estatístico dos resultados.

ANEXO II

A. Cálculo dos compostos fenólicos totais através da reacção de Folin-Ciocalteu

Tabela 0.2 – Absorvância a 765nm das soluções-padrão de ácido gálico após a reacção de Folin-Ciocalteu

[Ácido gálico] (mM)	Abs _{médio} (765nm)
0	0
0,5	0,113
1,0	0,187
1,5	0,278
2,0	0,374
2,5	0,420
3,0	0,521

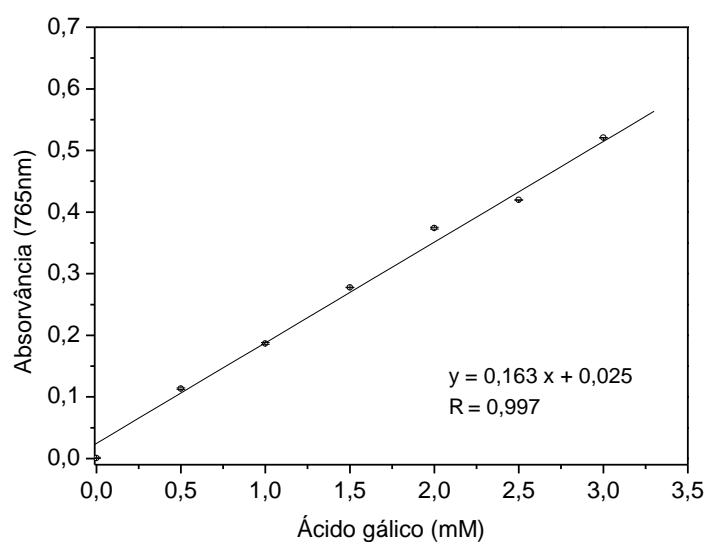


Figura 0.2 – Recta de calibração para o ácido gálico após reacção de Folin-Ciocalteu

Exemplo de cálculo do conteúdo em fenólicos totais da 1ª recolha para a água de cozedura (1ª réplica):

$$Abs(765\text{ nm}) = 0,164$$

$$Abs(765\text{ nm}) = 0,163 \times c_{ag} + 0,025 \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow c_{ag} = \frac{0,164 - 0,025}{0,163} \Leftrightarrow c_{ag} = 0,853\text{ EAG (mM)}$$

O resultado final foi afectado do correspondente factor de diluição ($FD = 5$), ou seja o conteúdo total em compostos fenólicos para o exemplo acima descrito foi de 4,265 EAG (mM). Para as restantes réplicas de ambas as amostras procedeu-se da mesma forma e fez-se o respectivo tratamento estatístico dos resultados.

B. Cálculo da concentração de compostos referência por HPLC

Ácido gálico

Tabela 0.3 – Área do pico cromatográfico do ácido gálico em função da concentração

[Ácido gálico] (mM)	Área do pico (mAU)
0,05	599931
0,15	1787009
0,50	5900951
0,80	9492653
1,00	11710250
2,00	23318374

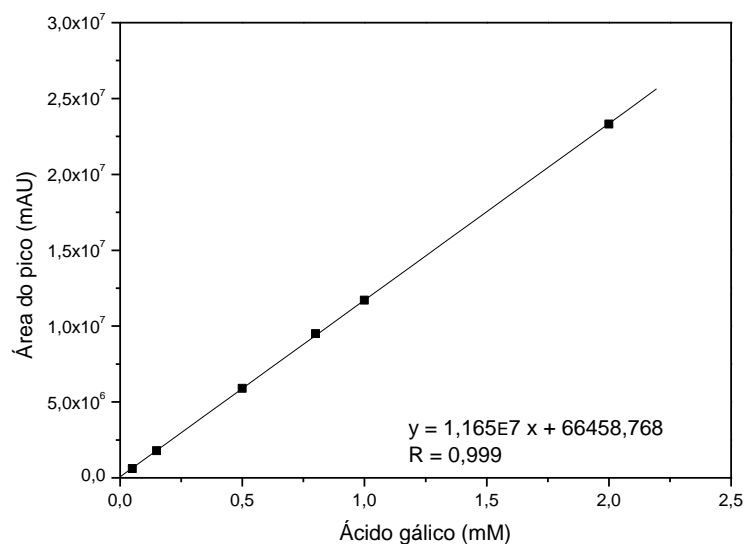


Figura 0.3 – Recta de calibração para as diferentes concentrações de ácido gálico (a 280 nm)

Exemplo de cálculo para a 1ª recolha da água de cozedura concentrada.

$$\text{Área}_{ag} = 2579064 \text{ mAU}$$

$$\text{Área}_{ag} = 1,165E7 c_{ag} + 66458,768 \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow c_{ag} = \frac{(2579064 - 66458,768)}{1,165E7} \Leftrightarrow c_{ag} = 0,216 \text{ mM de ácido gálico}$$

Os resultados finais foram afectados do correspondente factor de concentração ($FC=2$). Assim a concentração de ácido gálico no exemplo acima apresentado foi de 0,108 mM de ácido gálico. Para a determinação da concentração de ácido gálico nas restantes amostras procedeu-se do mesmo modo.

Ácido ferúlico

Tabela 0.4 – Área do pico cromatográfico do ácido ferúlico em função da concentração

[Ácido ferúlico] (mM)	Área do pico (mAU)
0,05	840676
0,15	2414850
0,50	7688098
0,80	12053915
1,00	14846718
2,00	28295985

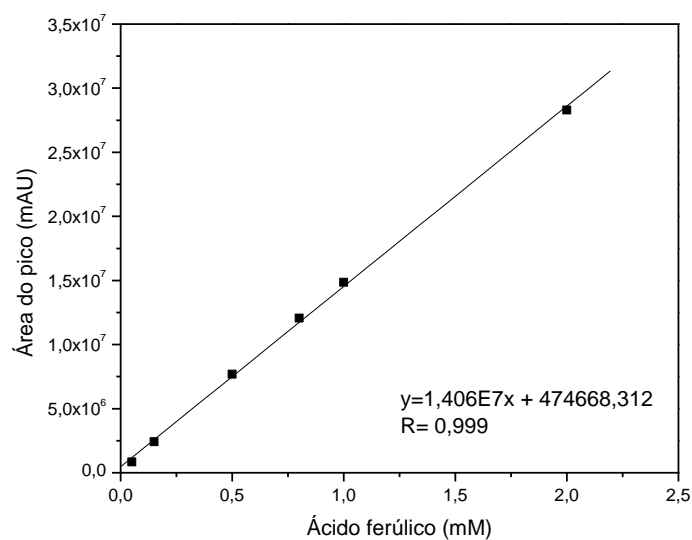


Figura 0.4 – Recta de calibração para as diferentes concentrações de ácido ferúlico (a 280 nm)

Hidroquinona

Tabela 0.5 – Área do pico cromatográfico do hidroquinona em função da concentração

[Hidroquinona] (mM)	Área do pico (mAU)
0,05	156705
0,15	485436
0,50	1542064
0,80	2483629
1,00	3132462
2,00	6171617

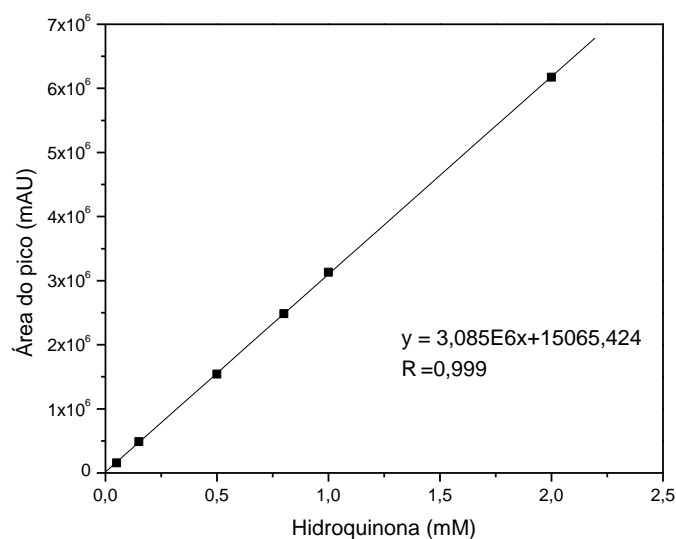


Figura 0.5 – Recta de calibração para as diferentes concentrações de hidroquinona (a 280 nm)

C. Reacção de sequestração do radical DPPH[•]

A determinação da percentagem de inibição do radical DPPH[•] para a solução-padrão de ácido gálico (0,05mM) foi efectuada da seguinte forma:

$$Abs_{controlo} = 0,394 \text{ nm}; Abs_{amostra} = 0,356 \text{ nm}$$

$$\% \text{ Inibição DPPH} = \left(\frac{Abs_{controlo} - Abs_{amostra}}{Abs_{controlo}} \right) \times 100 \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \% \text{ Inibição DPPH} = \left(\frac{0,394 - 0,356}{0,394} \right) \times 100 \Leftrightarrow \% \text{ Inibição DPPH} = 10 \%$$

O cálculo é idêntico para as restantes concentrações e compostos padrão testados.

Tabela 0.6 – % Inibição do radical DPPH[•] para os compostos padrão

Composto padrão	Concentração (mM)	Abs _{controlo}	Abs _{amostra}	% Inibição DPPH
Ácido gálico	0,05	0,394	0,356	10
	0,1		0,320	19
	0,25		0,209	47
	0,5		0,076	81
Ácido ferúlico	0,5	0,367	0,330	10
	0,8		0,308	16
	1,0		0,292	20
	1,5		0,253	31
Hidroquinona	0,5	0,356	0,249	30
	0,8		0,229	36
	1,5		0,181	49
	2,0		0,128	64

Os valores de EC₅₀ (concentração efectiva para inibir 50% do radical DPPH[•]) foram determinados através da equação da recta de calibração (Figura 0.6) de cada composto padrão estudado. Seguidamente exemplifica-se o cálculo para o ácido gálico:

$$EC_{50} = 157,702 c_{ag} + 3,592 \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow c_{ag} = \frac{50 - 3,592}{157,702} \Leftrightarrow x = 0,29 \text{ mM de ácido gálico}$$

A determinação do valor de EC₅₀ para o ácido ferúlico e hidroquinona foi efectuado da mesma forma acima exemplificada, diferindo apenas na utilização da equação da recta específica do composto em análise.

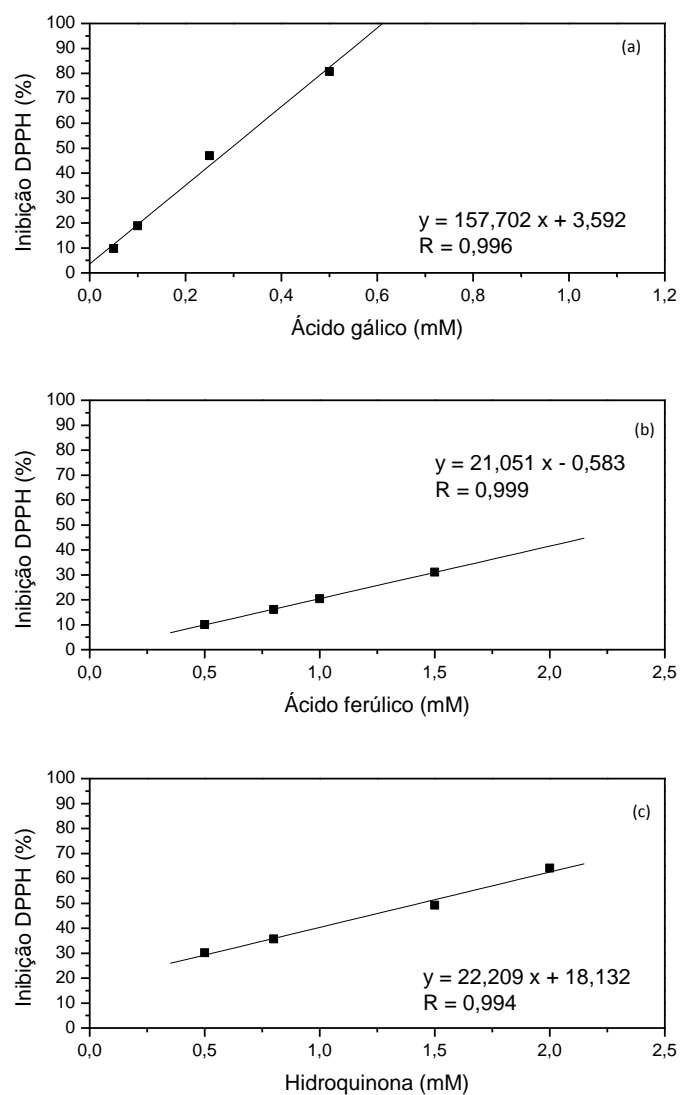


Figura 0.6 – % Inibição do DPPH para as várias concentrações de ácido gálico (a); ácido ferúlico (b); hidroquinona (c)

Seguidamente exemplifica-se a determinação da actividade antioxidante pelo método de sequestração do radical DPPH^{*} para a 1^a recolha da água de cozedura (1^a réplica):

$$Abs_{controlo} = 0,382 \text{ nm}; Abs_{amostra} = 0,093 \text{ nm}$$

$$\% \text{ Inibição DPPH} = \left(\frac{Abs_{controlo} - Abs_{amostra}}{Abs_{controlo}} \right) \times 100 \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \% \text{ Inibição DPPH} = \left(\frac{0,382 - 0,093}{0,382} \right) \times 100 \Leftrightarrow \% \text{ Inibição DPPH} = 76 \%$$

A quantificação da actividade antioxidante da amostra expressa em equivalentes de ácido gálico (mM) foi determinada através da equação da recta de calibração (Figura 0.6 a):

$$\% \text{ Inibição DPPH} = 157,702 c_{ag} + 3,592 \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow c_{ag} = \frac{76 - 3,592}{157,702} \Leftrightarrow c_{ag} = 0,459 \text{ EAG (mM)}$$

Para as restantes réplicas de ambas as amostras procedeu-se da mesma forma e fez-se o respectivo tratamento estatístico dos resultados.

D. Cálculo da actividade antiradicalar relativa ao anião radical superóxido por fotoquimioluminescência para extractos aquosos (ACW)

A determinação da percentagem de inibição do radical anião superóxido para o ácido ascórbico foi efectuada a partir do integral da área abaixo da curva obtida experimentalmente da seguinte forma:

Amostra: ácido ascórbico 0,05 $\mu\text{mol/mL}$

Integral da área (IA) – 143,016; Integral da área no ensaio em branco (EB) – 173,048

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(EB - IA)}{EB} \times 100 \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \% \text{ Inibição} = \frac{(173,048 - 143,016)}{173,048} \times 100 \Leftrightarrow \% \text{ Inibição} = 17 \%$$

Para as restantes soluções-padrão testadas o cálculo foi efectuada da mesma forma (Tabela 0.7).

Tabela 0.7 – Concentrações de ácido ascórbico e respectiva inibição do radical

[Ácido ascórbico] ($\mu\text{mol/mL}$)	Integral da área	Inibição radical anião superóxido (%)
0,05	143,016	17
0,1	126,935	27
0,2	86,733	50
0,3	47,289	73

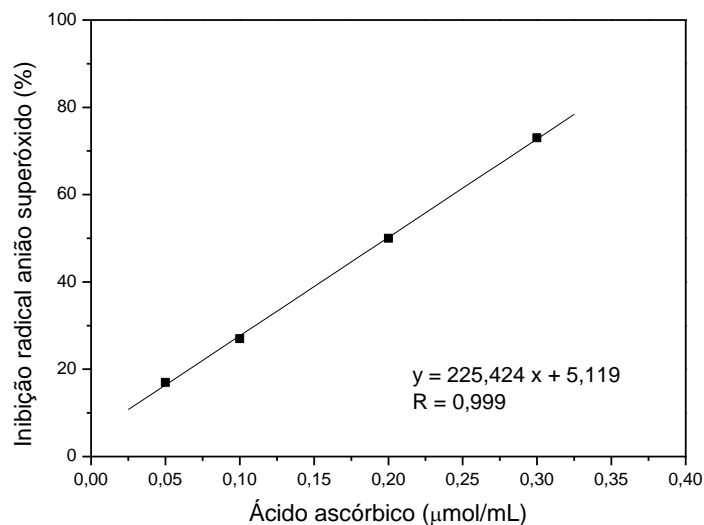


Figura 0.7 – Recta de calibração do ácido ascórbico

Em relação aos cálculos para o extracto aquoso, para determinar a percentagem de inibição do radical anião superóxido, foram efectuados a partir do integral da área abaixo da curva obtida experimentalmente da seguinte forma:

Amostra: 1ª recolha da água de cozedura, 1ª réplica

Integral da área (IA) – 29,542; *Integral da área no ensaio em branco (EB)* – 173,048

$$\begin{aligned} \% \text{ Inibição} &= \frac{(EB - IA)}{EB} \times 100 \Leftrightarrow \\ \Leftrightarrow \% \text{ Inibição} &= \frac{(173,048 - 29,542)}{173,048} \times 100 \Leftrightarrow \% \text{ Inibição} = 83 \% \end{aligned}$$

Para determinar a quantidade equivalente de ácido ascórbico com capacidade para inibir em 83% a formação do radical anião superóxido, utilizou-se a recta de calibração (Figura 0.7), efectuaram-se os seguintes cálculos:

$$\begin{aligned} \% \text{ Inibição} &= 225,424 c_{aa} + 5,119 \Leftrightarrow \\ \Leftrightarrow c_{aa} &= \frac{83 - 5,119}{225,424} \Leftrightarrow c_{aa} = 0,35 \text{ EAA } (\mu\text{mol/mL}) \end{aligned}$$

Tendo em conta o factor de diluição utilizado ($FD=50$), a 1ª recolha da água de cozedura (1ª réplica) apresenta uma quantidade de equivalentes de ácido ascórbico de 17,27 μmol/mL. Para as restantes réplicas de ambas as amostras procedeu-se da mesma forma e fez-se o respectivo tratamento estatístico dos resultados.

E. Cálculo da actividade antiradicalar relativa ao anião radical superóxido por fotoquimioluminescência para extractos lipídicos (ACL)

A determinação da percentagem de inibição do radical anião superóxido para o trolox foi efectuada a partir do integral da área abaixo da curva obtida experimentalmente da seguinte forma:

Amostra: trolox 0,05 $\mu\text{mol/mL}$

Integral da área (IA) – 318,301; Integral da área no ensaio em branco (EB) – 353,480

$$\begin{aligned} \% \text{ Inibição} &= \frac{(EB - IA)}{EB} \times 100 \Leftrightarrow \\ \Leftrightarrow \% \text{ Inibição} &= \frac{(353,480 - 318,301)}{353,480} \times 100 \Leftrightarrow \% \text{ Inibição} = 10 \% \end{aligned}$$

Para as restantes soluções-padrão testadas o cálculo foi efectuado da mesma forma (Tabela 0.8).

Tabela 0.8 – Concentrações de trolox e respectiva inibição do radical

[Trolox] ($\mu\text{mol/mL}$)	Integral da área	Inibição radical anião superóxido (%)
0,05	318,301	10
0,1	284,437	20
0,2	222,385	37
0,3	164,603	53
0,4	115,264	67

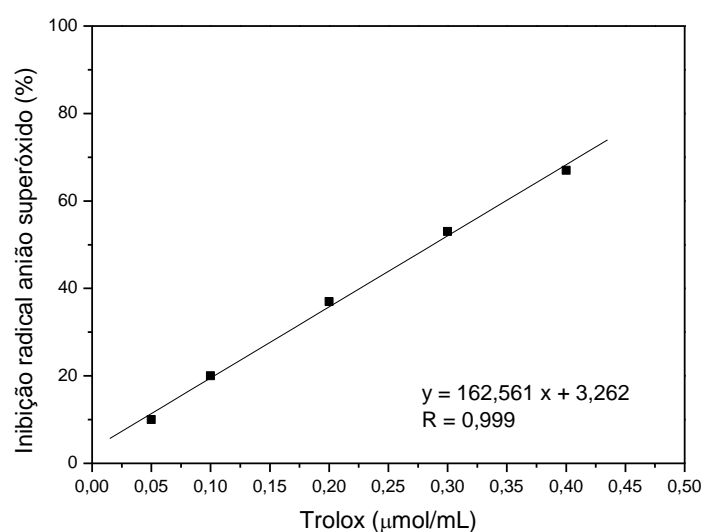


Figura 0.8 – Recta de calibração do trolox

Na determinação da percentagem de inibição do radical anião superóxido para o extracto lipídico dos compostos padrão testados e das amostras, os cálculos foram efectuados do mesmo modo acima descrito para o trolox. Em seguida apresenta-se um exemplo para a 1ª recolha da água de cozedura (1ª réplica), com o respectivo cálculo da quantidade equivalente de trolox:

Integral da área (IA) – 140,974; Integral da área no ensaio em branco (EB) – 353,480

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(EB - IA)}{EB} \times 100 \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \% \text{ Inibição} = \frac{(353,480 - 140,974)}{353,480} \times 100 \Leftrightarrow \% \text{ Inibição} = 60 \%$$

A determinação da quantidade equivalente de trolox com capacidade de inibir em 60 % a formação do radical anião superóxido foi efectuada através da recta de calibração (Figura 0.8):

$$I (\%) = 162,561 c_t + 3,262 \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow c_t = \frac{60 - 3,262}{162,561} \Leftrightarrow c_t = 0,35 \text{ ET } (\mu\text{mol/mL})$$

Procedendo à correcção com o factor de diluição ($FD=50$) a que as amostras foram afectadas, a 1ª recolha da água de cozedura (1ª réplica) apresenta uma quantidade de equivalentes de trolox de 17,5 $\mu\text{mol/mL}$. Para as restantes réplicas de ambas as amostras procedeu-se da mesma forma e fez-se o respectivo tratamento estatístico dos resultados.

F. Cálculo do poder antioxidante de redução férrica (FRAP)

Tabela 0.9 – Absorvância a 593nm do sulfato ferroso a diferentes concentrações

[Sulfato ferroso] (mM)	Abs _{médio} (593nm)
0	0,071
0,1	0,134
0,2	0,189
0,6	0,555
0,8	0,610
1,0	0,723
1,2	1,008
1,4	1,080

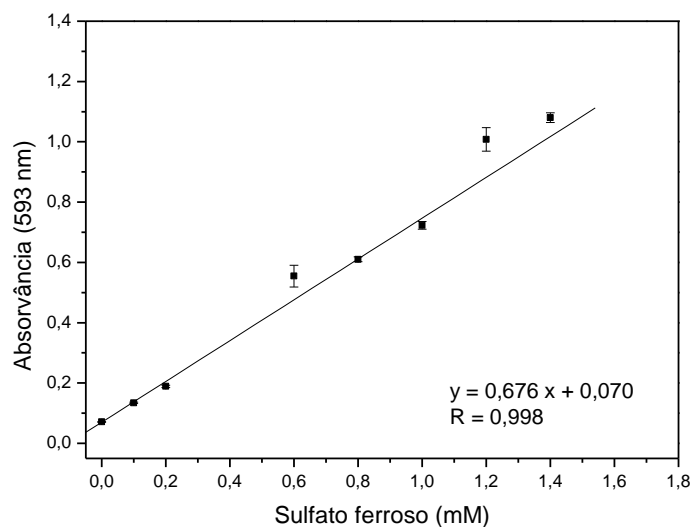


Figura 0.9 – Recta de calibração para o método FRAP

Exemplo de cálculo do poder redutor férrico da 1ª recolha para a água de cozedura (1ª réplica) em equivalentes de sulfato ferroso (mM):

$$Abs(593nm) = 0,188$$

$$Abs(593nm) = 0,676 c_{sf} + 0,070 \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow c_{sf} = \frac{0,188 - 0,070}{0,676} \Leftrightarrow c_{sf} = 0,175 \text{ ESF (mM)}$$

Aplicando o factor de diluição ($FD=50$) a que as amostras foram afectadas, a 1ª recolha da água de cozedura (1ª réplica) apresenta uma quantidade equivalente de sulfato ferroso de 8,728 mM. Para as restantes réplicas de ambas as amostras procedeu-se da mesma forma e fez-se o respectivo tratamento estatístico dos resultados.

O cálculo do poder redutor férrico expresso em equivalentes de sulfato ferroso para os compostos padrão estudados foi idêntico ao exemplo acima descrito, diferenciando apenas de não ter sido aplicado um factor de diluição.